



Ana Rita Almeida Barreto

Licenciada em Ciências Forenses e Criminais

Implementação de um Método de Análise de Melamina em Alimentos por HPLC

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte, Professora Auxiliar,
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Co-Orientadora: Engenheira Paula Branco, Unidade Laboratorial de Físico-Química do Laboratório de Segurança Alimentar da ASAE

Júri

Presidente: Prof^ª. Doutora Benilde Simões Mendes -FCT/UNL

Arguente: Prof^ª. Doutora Maria Margarida Boavida Pontes Gonçalves- FCT/UNL

Vogal: Prof^ª Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte-FCT/UNL



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro de 2017



Ana Rita Almeida Barreto

Licenciada em Ciências Forenses e Criminais

Implementação de um Método de Análise de Melamina em Alimentos por HPLC

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte, Professora Auxiliar,
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Co-Orientadora: Engenheira Paula Branco, Unidade Laboratorial de Físico-Química do Laboratório de Segurança Alimentar da ASAE



Setembro de 2017

COPYRIGHT

Copyright © - Todos os direitos reservados. Ana Rita Almeida Barreto. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

“Implementação de um Método de Análise de Melamina em Alimentos por HPLC”

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, queria agradecer à Engenheira Maria de Jesus Tavares e à Engenheira Maria da Graça Campos, pela oportunidade que me concederam de realizar o meu estágio na ASAE, tendo sido um período bastante enriquecedor, contribuindo, em larga escala, para a minha formação, enquanto profissional nesta área, tendo-me proporcionado aprendizagens importantes para o futuro.

Queria, também, agradecer à minha co-orientadora, Engenheira Paula Branco por toda a paciência, dedicação, disponibilidade e ajuda prestada, durante todas as etapas do período de estágio.

Quero, ainda, agradecer a todos os profissionais que trabalham diariamente na ASAE e que contribuíram, directa ou indirectamente, para a conclusão deste trabalho e, também, pela forma como fui recebida, facilitando o processo de adaptação.

Queria prestar o meu agradecimento à minha orientadora, Professora Paula Duarte, por toda a disponibilidade, empenho e apoio prestado, ao longo destes meses de estágio.

Queria, também, agradecer à Professora Benilde Mendes e aos restantes docentes deste Mestrado, que, ao longo dos últimos dois anos, foram os principais responsáveis pela transmissão do conhecimento, por promoverem activamente a paixão dos seus alunos por esta área e por sempre se terem mostrado disponíveis para auxiliar no que fosse necessário.

À minha família, pelo apoio incondicional e por estarem sempre do meu lado, em todas as etapas da minha vida, por me terem, sempre, incentivado a lutar, com determinação, pelos meus objectivos, pela educação, dedicação e força que me têm transmitido.

Por fim, queria, também, agradecer aos meus amigos, especialmente a duas grandes amigas, Sara Pereira e Andreia Ribeiro.

Resumo

A melamina é um composto químico utilizado essencialmente no fabrico de laminados, plásticos e revestimentos, incluindo materiais para contacto com alimentos. Contudo, devido à sua estrutura química também tem sido utilizada em actividades fraudulentas, para simulação de teores proteicos em matrizes alimentares, tendo causado numerosos incidentes em seres humanos e em animais.

Actualmente, a melamina também tem sido encontrada em géneros alimentícios através de migração e/ou contaminação pela degradação do precursor ciromazina.

O presente trabalho teve como objectivo a implementação de um método de detecção e quantificação de melamina em alimentos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Para tal foram realizados testes preliminares utilizando três métodos, dos quais foi seleccionado o método - “Método I- MM Luna”.

Após a selecção do método, procedeu-se à sua validação, recorrendo-se para esse efeito a cinco matrizes críticas para os tipos de contaminação/adulteração acima referidos: leite sem lactose, ovos, bebida de soja, rebuçados de leite e bolachas de arroz.

Avaliaram-se parâmetros como linearidade, limites de detecção e quantificação, repetibilidade, precisão intermédia e exactidão. Os resultados mostraram que o método é adequado para as matrizes alimentares testadas, tendo-se obtido uma curva de calibração com um coeficiente de correlação de Pearson de 0,9999, para uma gama de trabalho entre 25 e 500 ng/mL. O método apresentou um limite de detecção de 0,2 mg/kg e um limite de quantificação de 0,6 mg/kg; avaliou-se também a precisão do método, obtendo-se um limite de repetibilidade experimental de 0,41 mg/kg, para uma concentração de melamina próxima do Limite Máximo Admissível, 2,5 mg/kg, e um limite de precisão intermédia experimental de 27,7 mg/kg, para uma concentração de Melamina de aproximadamente 140 mg/kg. Foi ainda testada a exactidão através do cálculo de taxas de recuperação, que variaram entre 66 e 99%, consoante as matrizes, e através da análise do Material de Referência “FAPAS 3039 - Leite em Pó”, obtendo-se um *z-score* satisfatório de 0,7.

Palavras-chave: Melamina; HPLC; Implementação; Validação; Matrizes Alimentares.

Abstract

Melamine is a chemical compound essentially used in the manufacture of laminates, plastics and coatings, including food contact materials. However, due to its chemical structure, it has also been used in fraudulent activities to simulate protein levels in food matrices, causing numerous incidents in humans and animals.

At present, melamine has also been found in food through migration and/or contamination by the degradation of cyromazine precursor.

The present work had as objective the implementation of a detection and quantification method of melamine in food, by High Performance Liquid Chromatography. With this purpose, preliminary tests were performed using three methods, and the most effective one - "MM Luna Method", was selected.

After the method's selection, its validation was performed using five critical matrices for this type of contamination and/or adulteration: lactose-free milk, eggs, soy drink, milk candies and rice crackers.

Parameters such as linearity, detection and quantification limits, repeatability, intermediate precision and accuracy were evaluated. The results demonstrate that the method is suitable for these tested food matrices, where it was obtained a calibration curve with a Pearson's correlation coefficient of 0.9999, for a working range of 25-500 ng /mL; The method showed a detection limit of 0,2 mg/kg and a quantification limit of 0,6 mg/kg; The method's precision was also evaluated, and it was obtained an experimental repeatability of 0,41 mg/kg, for a melamine concentration near the Maximum Limit, 2,5 mg/kg, and an experimental intermediate precision of 27,7 mg/kg, for a melamine concentration around 140 mg/kg; the accuracy was also tested by calculating recovery rates, that varied between 66 and 99%, depending on the matrices, and also through the analyses of the Reference Material "FAPAS 3039 - Milk Powder", with a satisfactory *z-score* of 0,7.

Keywords: Melamine; HPLC; Implementation; Validation; Food Matrices.

Índice de Matérias

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. CONTEXTUALIZAÇÃO DA PROBLEMÁTICA DA MELAMINA EM GÉNEROS ALIMENTÍCIOS E EM ALIMENTOS PARA ANIMAIS.....	1
1.2. CARACTERIZAÇÃO DA MELAMINA E DOS SEUS COMPOSTOS ANÁLOGOS.....	2
1.3. METABOLISMO E TOXICIDADE DA MELAMINA.....	3
1.4. OCORRÊNCIA DE MELAMINA EM GÉNEROS ALIMENTÍCIOS E EM ALIMENTAÇÃO ANIMAL.....	4
1.4.1 PRINCIPAIS INCIDENTES ANTES DE 2008.....	5
1.4.2. FRAUDE COM O LEITE EM PÓ ORIGINÁRIO DA CHINA E OUTROS INCIDENTES NO ANO DE 2008	6
1.4.3. PRINCIPAIS INCIDENTES RELACIONADOS COM CONTAMINAÇÃO E MIGRAÇÃO APÓS O ANO DE 2008.....	7
1.5. LEGISLAÇÃO.....	8
1.6 ASAE.....	10
1.7. MÉTODOS DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MELAMINA.....	12
1.7.1. ELISA (ENZYME LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY).....	13
1.7.2. EIA (ENZYME IMMUNOASSAY).....	13
1.7.3. FTIR (FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY).....	13
1.7.4. CE (ELECTROFORESE CAPILAR).....	14
1.7.5. HPLC (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY).....	14
1.7.6. GC (GAS CHROMATOGRAPHY).....	14
1.7.7. TÉCNICAS ACOPLADAS À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MS).....	15
1.8. VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	15
1.9. ENQUADRAMENTO E OBJECTIVOS DO TRABALHO.....	20
2. MATERIAIS E MÉTODOS	21

2.1. REAGENTES.....	21
2.2.MÉTODOS DE HPLC UTILIZADOS NOS ENSAIOS PRELIMINARES.....	21
2.2.1.PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PADRÃO DE MELAMINA	21
2.2.2.MÉTODO I-MM LUNA.....	23
2.2.3 MÉTODO II-MM BIOPHARM	24
2.2.4. MÉTODO III- AGILENT	25
2.2.5. CONTROLO DE QUALIDADE DA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	27
2.2.6. PONTOS DE CONTROLO DO MÉTODO.....	27
3.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
3.1. SELECÇÃO DO MÉTODO A ADOPTAR.....	29
3.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO I-MM LUNA.....	36
3.2.1. ESPECIFICIDADE/SELECTIVIDADE.....	36
3.2.2. CURVA DE CALIBRAÇÃO (LINEARIDADE,GAMA DE TRABALHO E LIMIARES ANALÍTICOS).....	48
3.2.3. LIMITES DO MÉTODO.....	50
3.2.4. PRECISÃO.....	51
3.2.5. EXACTIDÃO.....	55
4. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

Índice de Figuras

Figura 1.1: Reacção de decomposição da ureia em ácido ciânico e amoníaco.....	1
Figura 1.2: Reacção de polimerização do ácido ciânico em melamina e dióxido de carbono.....	1
Figura 1.3 Estruturas químicas da Melamina e da Ciromazina.....	1
Figura 1.4: Gráfico percentual das várias categorias de produtos para o total de notificações de melamina no ano de 2008.....	7
Figura 1.5: A distribuição percentual das amostras analisadas (para controlo da Melamina) pelos respectivos países de origem, no período compreendido entre 2008 e Fevereiro de 2013. (Branco, 2013).....	11
Figura 2.1: Procedimentos efectuados na etapa” <i>Clean-up</i> ”.....	26
Figura 3.1: Perfil cromatográfico a 210 nm da solução padrão de melamina a 100ng/mL (Método I-MM Luna).....	29
Figura 3.2: Espectro de UV/Vis da solução padrão de trabalho a 100 ng/mL	30
Figura 3.3: Perfil cromatográfico a 210 nm da solução do Branco de Procedimento Fortificada a 2,5 mg/kg (Método I).....	30
Figura 3.4: Espectro de UV/Vis da solução do Branco de Procedimento Fortificado a 2,5mg/kg (Método I).....	31
Figura 3.5: Perfil de pureza do Branco de Procedimento Fortificado a 2,5 mg/kg (MétodoI).....	31
Figura 3.6: Perfil cromatográfico a 210 nm da solução do Branco de Procedimento Fortificada a 2,5 mg/kg (Método II).....	32
Figura 3.7: Espectro de UV/Vis da solução do Branco de Procedimento Fortificado a 2,5 mg/kg (Método II).....	32
Figura 3.8: Perfil de pureza do Branco de Procedimento Fortificado a 2,5 mg/kg (MétodoII).....	33
Figura 3.9: Perfil cromatográfico a 210 nm da solução do Branco de Procedimento Fortificada a 2,5 mg/kg (Método III).....	33

Figura 3.10: Espectro de UV/Vis da solução do Branco de Procedimento Fortificado a 2,5 mg/kg (Método III).....	34
Figura 3.11: Perfil de pureza do Branco de Procedimento Fortificado a 2,5 mg/kg (Método III).....	34
Figura 3.12: Perfil cromatográfico a 210 nm da fase móvel (80%ACN: 20%NH ₄ COO) utilizada no Método III.....	35
Figura 3.13: Perfil cromatográfico a 210 nm da matriz “Bolacha de Arroz não fortificada”.....	38
Figura 3.14: Perfil cromatográfico a 210 nm da matriz “Bolacha de Arroz Fortificada a 2,5mg/kg”.....	38
Figura 3.15: Perfil de pureza da “Bolacha de Arroz Fortificada a 2,5 mg/kg”.....	38
Figura 3.16: Espectro de UV/Vis da matriz “ Bolacha de Arroz Fortificada a 2,5 mg/kg”.....	39
Figura 3.17: Perfil cromatográfico a 210 nm da matriz “Ovo não fortificado”.....	40
Figura 3.18: Perfil cromatográfico a 210 nm da matriz “Ovo Fortificado a 2,5 mg/kg”.....	41
Figura 3.19: Perfil de pureza do “Ovo Fortificado a 2,5 mg/kg”.....	41
Figura 3.20: Espectro de UV/Vis da matriz “ Ovo Fortificado a 2,5 mg/kg”.....	42
Figura 3.21: Perfil cromatográfico a 210 nm da matriz “Rebuçados de Leite não fortificados”.....	42
Figura 3.22: Perfil cromatográfico a 210 nm da matriz “Rebuçados de Leite Fortificados a 2,5 mg/kg”.....	43
Figura 3.23: Perfil de pureza dos “Rebuçados de Leite Fortificados a 2, 5 mg/kg”.....	43
Figura 3.24: Espectro de UV/Vis da matriz “ Rebuçados de Leite Fortificados a 2,5 mg/kg”.....	44
Figura 3.25: Perfil cromatográfico a 210 nm da matriz “Bebida de Soja não fortificado”.....	44

Figura 3.26: Perfil cromatográfico a 210 nm da matriz “Bebida de Soja Fortificada a 2,5 mg/kg”.....	45
Figura 3.27: Perfil de pureza do “Bebida de Soja Fortificado a 2,5 mg/kg”.....	45
Figura 3.28: Espectro de UV/Vis da matriz “Bebida de Soja Fortificado a 2,5 mg/kg”.....	46
Figura 3.29: Perfil cromatográfico a 210 nm da matriz “Leite sem Lactose não fortificado”.....	46
Figura 3.30: Perfil cromatográfico a 210 nm da matriz “Leite sem Lactose Fortificado a 2,5mg/kg”.....	47
Figura 3.31: Perfil de pureza do “Leite sem Lactose Fortificado a 2,5 mg/kg ”.....	47
Figura 3.32: Espectro de UV/Vis da matriz “Leite sem Lactose Fortificado a 2, 5 mg/kg”.....	48
Figura 3.33: Gráfico da curva de calibração.....	49
Figura 3.34: Perfil cromatográfico a 210 nm do “FAPAS 3039-Leite em Pó”.....	57
Figura 3.35: Perfil de pureza do “FAPAS 3039-Leite em Pó”.....	57
Figura 3.36: Espectro de UV/Vis da matriz “FAPAS 3039- Leite em Pó”.....	58

Índice de Tabelas

Tabela 1.1: Propriedades físico-químicas da melamina e dos seus metabolitos (EFSA,2010; Escobar <i>et al.</i> , 2010; Marín <i>et al.</i> , 2014).....	2
Tabela 1.2: Número de notificações de melamina presentes no RASFF, sua classificação e respectivo ano das mesmas.....	5
Tabela 1.3: Número de amostras analisadas para determinação de melamina, por ano, pela ASAE, no período de 2008 até final de Fevereiro de 2013 (Branco, 2013).....	11
Tabela 1.4: Número de amostras analisadas e respectivo grupo de géneros alimentícios (Branco, 2013).....	12
Tabela 1.5: Factor de conversão para fracção mássica.....	18
Tabela 2.1: Preparação das várias soluções padrão de melamina utilizados para a curva de calibração.....	22
Tabela 2.2: Condições cromatográficas seleccionadas para o Método I- MM Luna.....	24
Tabela 2.3: Condições cromatográficas seleccionadas para o Método II- MM Biopharm	25
Tabela 2.4: Condições cromatográficas seleccionadas para o Método III- MM Agilent	27
Tabela 3.1: Percentagens de recuperação de melamina a partir dos Brancos de Procedimentos e da matriz alimentar (bolachas de arroz) fortificadas a 2,5 mg/kg utilizando os métodos I, II e III.....	36
Tabela 3.2: Dados dos padrões de trabalho de melamina usados na elaboração da curva de calibração.....	49
Tabela 3.3: Figuras de mérito da curva de calibração.....	49
Tabela 3.4: Ensaio de injeção do padrão 50 ng/mL.....	51
Tabela 3.5: Resultados obtidos no Teste de Dixon para um intervalo de confiança de 95%.....	52
Tabela 3.6: Resultados obtidos para a precisão intermédia do método.....	54
Tabela 3.7: Resultados obtidos para a repetibilidade do método.....	54

Tabela 3.8: Percentagens de recuperação de melamina nas cinco matrizes alimentares analisadas.....	55
Tabela 3.9: Dados para o cálculo de <i>z-score</i> e respectivo valor obtido.....	56

Lista de Abreviaturas

ACN- Acetonitrilo

APCI – Atmospheric Pressure Chemical Ionization (Ionização Química à Pressão Atmosférica)

ASAE - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

CAS- American Chemical Society (Sociedade Química Americana)

CE- Capillary Electrophoresis (Electroforese Capilar)

CI- Chemical ionization (Ionização Química)

CONTAM - Contaminantes da Cadeia Alimentar

EEE- Espaço Económico Europeu

EFSA - European Food Safety Authority (Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos)

EFTA- European Free Trade Association (Associação Europeia de Livre Comércio)

EI- Impact Electronic (Impacto electrónico)

EIA- Enzyme Immunoassay (Imunoensaio Enzimático)

ELISA- Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (Ensaio de Imunossorvente Ligado a Enzimas)

ESA- Authority Surveillance EFTA (Autoridade de Vigilância da Associação Europeia de Livre Comércio)

ESI-ElectroSpray Ionization (Ionização por Electrospray)

FAPAS- Food Analysis Performance Assessment Scheme.

FTIR- Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Espectroscopia de Infravermelho de Transformação)

GC- Gas Chromatography (Cromatografia Gasosa)

GC-MS- Gas Chromatography Mass Spectrometry (Cromatografia Gasosa acoplada com Espectrometria de Massas)

HPLC/DAD - High Performance Liquid Chromatography/Diode Array Detector (sistema cromatográfico de Cromatografia Líquida de Alta Resolução equipado com um detector de fotodíodos)

IPAC- Instituto Português de Acreditação

LBPV- Laboratório de Bebidas e Produtos Vitivinícolas

LC-MS- Liquid Chromatography Mass Spectrometry (Cromatografia Líquida acoplada com Espectrometria de Massas)

LD- Limite de Detecção

LFQ- Laboratório de Físico-Química

LM- Laboratório de Microbiologia

LMA- Limite Máximo Admissível (2,5 ppm para MM segundo o regulamento (CE) nº594/2012)

LMR- Limites Máximos de Resíduos

LQ- Limite de Quantificação

LSA- Laboratório de Segurança Alimentar

MCA- Composto Melamina-Ácido Cianúrico

MM – Melamina

MR-Material de Referência

MS- Mass Spectrometry (Espectrometria de massas)

NaOH- Hidróxido de Sódio

nm- Nanómetro

PDA – Photo Dyode Array (Detector de fotodíodos)

PNCA- Plano Nacional de Colheita de Amostras

PP – Polipropileno

ppm- partes por milhão

RASFF - Rapid Alert System for Food and Feed (Sistema de Rede de Alerta Rápido para géneros alimentícios e alimentos para animais)

rpm- Rotações por minuto

SPE – Solid Phase Extraction (Extracção em Fase Sólida)

TDI- Tolerable Daily Intake (Dose de Ingestão Aceitável)

TFA- Ácido Trifluoroacético

% RSD- Desvio padrão relativo, em percentagem

% RSD_r - Desvio padrão relativo da repetibilidade, em percentagem

% RSD_R - Desvio padrão relativo da reprodutibilidade, em percentagem

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DA PROBLEMÁTICA DA MELAMINA EM GÊNEROS ALIMENTÍCIOS E EM ALIMENTOS PARA ANIMAIS

A melamina (2,4,6-triamino-1,3,5-triazina), com a fórmula molecular $C_3H_6N_6$ é produzida, principalmente para a síntese de resinas melamina-formaldeído, usadas no fabrico de laminados, plásticos e revestimentos, incluindo materiais para contacto com alimentos. Além desta utilização, a melamina também é utilizada como um retardador de chamas (EFSA, 2010).

Este composto foi sintetizado pela primeira vez por um cientista alemão, Justus von Liebig em 1834. Inicialmente, a produção de melamina ocorria quando cianamida de cálcio era convertida em dicianidiamida, e esta era aquecida acima do ponto de fusão.

Actualmente, a melamina é produzida através da degradação da ureia, ocorrendo neste processo duas etapas: uma primeira reacção endotérmica que decompõe a ureia para formar o ácido ciânico (HCNO) e amoníaco (**Figura 1.1**); e no segundo, uma reacção exotérmica de polimerização do ácido ciânico para formar a melamina com a libertação de dióxido de carbono juntamente (**Figura 1.2**) (Escobar *et al.*, 2010).

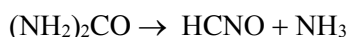


Figura 1.1: Reacção de decomposição da ureia em ácido ciânico e amoníaco.



Figura 1.2: Reacção de polimerização do ácido ciânico em melamina e dióxido de carbono.

A melamina também se apresenta na natureza através da degradação do pesticida e do medicamento veterinário, a ciromazina. A estrutura química da melamina, bem como a da ciromazina, encontram-se na **Figura 1.3**. Como se pode observar estes dois compostos têm uma estrutura química muito semelhante.

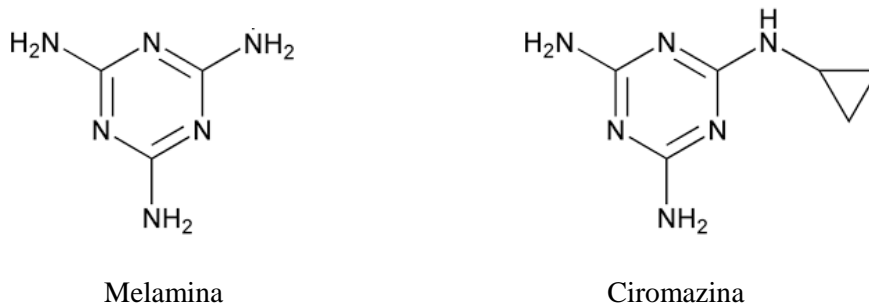
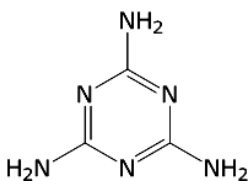
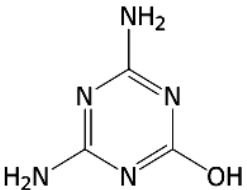
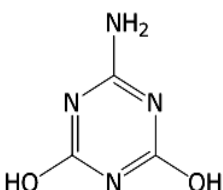
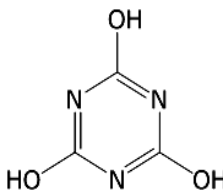


Figura 1.3: Estruturas químicas da melamina e da ciromazina.

1.2 CARACTERIZAÇÃO DA MELAMINA E DOS SEUS COMPOSTOS ANÁLOGOS

Dependendo do processo de hidrólise sequencial para substituir um, dois e depois três grupos amino, respectivamente, a melamina (MM) pode conter uma série de subprodutos estruturalmente relacionados, particularmente amelina, amelida e ácido cianúrico (**Tabela 1.1**). O *scrap melamine* é um resíduo da indústria da melamina que, além deste composto, contém quantidades residuais de oxitriazinas, incluindo o ácido cianúrico (EFSA, 2010).

Tabela 1.1: Propriedades físico-químicas da melamina e dos seus metabolitos (EFSA, 2010; Escobar *et al.*, 2010; Marín *et al.*, 2014).

	Melamina	Amelina	Amelida	Ácido cianúrico
Sinónimos	Cianuramida, Cianurotriamida, 2,4,6-Triamino-1,3,5-triazina	4,6-diamino-2-hidroxi-1,3,5-triazina	6-amino-2,4-di-hidroxi-1,3,5-triazina	Trihidroxicianidina; 2,4,6-tri-hidroxi-1,3,5-triazina
Fórmula Molecular	C ₃ H ₆ N ₆	C ₃ H ₅ N ₅ O	C ₃ H ₄ N ₄ O ₂	C ₃ H ₃ N ₃ O ₃
Estruturas Químicas				
Massa Molecular (g/mol)	126,1	127,1	128,1	129,1
Percentagem de composição	C: 28,6; H:4,8; N: 66,6	C:28,4; H:3,9; N:55,1;O:12,6	C:28,1; H:3,2; N:43,7; O: 24,9	C:27,9;H:2,3 N:32,6;O:37,1
Descrição Física	Pó branco	Pó branco	Pó branco	Pó branco
Pontos de Fusão (°C)	347-354	Decompõe-se antes que se possa liquefazer	170	360
Solubilidade	Ligeiramente solúvel em água fria e em solventes orgânicos polares; essencialmente insolúvel em solventes não polares (benzeno, hexano e éter); mais solúvel a pH ácido.	Solúvel tanto em álcoois alcalinos e em ácidos minerais	Praticamente insolúvel em água	Pouco solúvel em água fria; bastante insolúvel em solventes orgânicos tanto polares como não polares; mais solúvel a pH alcalino.
Constantes de Dissociação	pK_a 5.35 a 25°C em H ₂ O.	-----	-----	pK_a de 4.74 a 25°C em H ₂ O
Outras características	Carácter fracamente básico	Fracas propriedades básicas; É o primeiro metabolito da hidrólise da MM.	Quando se decompõe, forma dióxido de carbono e amónia	Carácter ácido; É o último metabolito da decomposição da MM. Também ocorre como um produto de dissociação de dicloro-isocianuratos

1.3 METABOLISMO E TOXICIDADE DA MELAMINA

Existem dados limitados sobre a toxicocinética da melamina e dos seus compostos análogos. Contudo, estudos em animais mostraram que a melamina não é metabolizada por estes, uma vez que a conseguem excretar em mais de 90%, através da urina, num intervalo de 24 horas, não ocorrendo acumulação significativa deste composto nos tecidos (Escobar *et.al.*, 2010).

Nos seres humanos este composto é oxidado, originando a formação de cristais no trato urinário, constituídos por complexos melamina com substâncias como ácido úrico que ocorrem naturalmente na urina e por complexos moleculares - MCA (Melamina-Ácido Cianúrico), que ocorrem devido à sua metabolização. Embora a caracterização dos parâmetros que conduzam à formação do complexo MCA seja incompleta, estima-se que a solubilidade deste complexo seja aproximadamente 1000 vezes menor do que a dos compostos individuais, existindo provas directas de que a exposição combinada a ambos os compostos é mais nefrotóxica do que a exposição isolada à melamina ou ao ácido cianúrico.

A formação destes complexos é altamente dependente da concentração de melamina e da composição da urina (por exemplo, pH, ácido úrico, proteína). A co-precipitação de melamina com ácido úrico é mais provável de ocorrer em seres humanos, uma vez que eles excretam mais ácido úrico na urina do que a maioria dos mamíferos devido à falta de enzima urato oxidase. Além disso, o pH urinário é menor em seres humanos do que na maioria dos animais, aumentando a probabilidade de formação de complexos insolúveis entre melamina e ácido úrico. Em neonatos, a formação destes complexos é ainda maior, visto a excreção de ácido úrico na urina ser maior do que em adultos (EFSA, 2010).

Em relação ao seu efeito cancerígeno, a melamina foi muito recentemente classificada pela Agência internacional para a pesquisa sobre o cancro (IARC) como agente possivelmente cancerígeno para o Homem (Grupo 2B) (IARC, 2017).

Nos géneros alimentícios a melamina pode surgir de três formas: contaminação; migração e acção fraudulenta. A contaminação ocorre devido à melamina ser, tal como referido no ponto 1.1, um metabolito da ciromazina, composto que é utilizado como pesticida ou como fármaco de uso veterinário. A EFSA (2015) realizou uma análise de risco de exposição alimentar à ciromazina e à melamina. Nesta análise a EFSA considerou uma dose diária tolerável (TDI) de 0,2 mg/kg tanto para a ciromazina como para a melamina. Nesta avaliação, tanto a nível da toxicidade crónica como a nível da toxicidade aguda, a EFSA não identificou preocupações de consumo a longo prazo, nem nenhum risco agudo para o consumidor, para qualquer uma das dietas europeias. Há ainda a salientar que estes estudos têm em atenção o facto de a ciromazina ser utilizada de acordo com a legislação vigente.

A exposição através da migração resulta do contacto dos alimentos com as embalagens em que se encontram ou com utensílios utilizados na sua confecção. Os revestimentos protectores usados no interior das latas metálicas, os plásticos de melamina-formaldeído, o papel, cartão e adesivos são exemplos de materiais que contactam com os alimentos e que podem originar a migração da

melamina. A melamina é reactiva com outras substâncias iniciadoras presentes em plásticos, que se destinam a entrar em contacto com alimentos, principalmente com o formaldeído e com a ureia. Um exemplo do produto da reacção descrita anteriormente entre o formaldeído e a melamina é a produção de plástico termoendurecido chamado *melaware*, um produto usado no fabrico de utensílios de cozinha.

A distinção entre uma substância iniciadora e um aditivo é que a primeira é consumida por reacção química e, portanto, qualquer resíduo desse produto químico que permaneça no material ou artigo acabado, geralmente não é intencional, em contrapartida, um aditivo pretende estar presente no polímero ou no material acabado em concentração suficiente para atingir um efeito técnico (EFSA, 2010).

Tendo em consideração o uso de cenários de migração, verificou-se que a exposição à melamina a partir de materiais de contacto com alimentos, como o *melaware*, se situou abaixo ou na gama do TDI estabelecido para a melamina, não constituindo por isso uma preocupação para a saúde dos consumidores. Assim, foi recomendado que o limite de migração actual da melamina a partir de materiais de contacto com alimentos (30 mg/kg) seja reconsiderado à luz do TDI de 0,2 mg / kg de peso, tendo em conta todas as possíveis fontes de exposição (EFSA, 2010). Mais ainda é sabido que a capacidade da melamina para formar cristais aumenta na presença do ácido cianúrico, pelo que o TDI estimado pode não ser suficiente para assegurar a segurança dos consumidores nos casos em que ocorra a exposição conjunta a estes dois compostos (EFSA, 2010).

Por fim, a exposição à melamina pode ainda resultar de acção fraudulenta, sendo que esta forma de exposição é a que mais impacto tem tido a nível da saúde humana e de animais de estimação, sendo a que tem originado a maior incidência de efeitos de toxicidade aguda, provocando inclusive a morte.

1.4 OCORRÊNCIA DE MELAMINA EM GÉNEROS ALIMENTÍCIOS E EM ALIMENTAÇÃO ANIMAL

A melamina tem causado muitos incidentes desde o ano de 2003 até à actualidade. As notificações destas ocorrências podem ser consultadas no portal do RASFF (*Rapid Alert System for Food and Feed*). O sistema RASFF foi implementado pela Comissão Europeia em 2004 para fornecer aos Estados-Membros, através das respectivas Autoridades Nacionais de controlo de géneros alimentícios e alimentos para animais, uma ferramenta eficaz para a troca de informações no âmbito da segurança alimentar. A sua eficácia é assegurada mantendo a sua estrutura simples: consiste essencialmente em pontos de contacto claramente identificados na Comissão, EFSA, EEE (Espaço Económico Europeu) e a nível nacional nos países membros, trocando informações de forma clara e estruturada por meio de modelos. Actualmente encontram-se neste sistema 32 países (RASFF, 2017). Perante a detecção de qualquer risco para a segurança alimentar relacionado com os géneros

alimentícios ou com os alimentos para animais, são emitidas notificações do tipo alerta, quando se referem a géneros alimentícios ou a alimentos para animais que já se encontram no mercado e que representam um risco grave, sendo necessário adoptar medidas urgentes; notificação de informação, quando se referem a situações em que o risco está identificado, mas não suscita uma acção imediata; notificações de notícia, quando se referem a um produto que se encontra no mercado externo; e, por último, notificação de rejeição em fronteira, quando se referem a produtos cuja entrada na União Europeia foi rejeitada.

Segundo o portal do RASFF, até ao dia 31 de Março de 2017, foi possível quantificar 371 notificações relacionadas com a melamina, como apresentado na **Tabela 1.2**. No entanto, os anos de 2007 e de 2008 foram os que causaram maior impacto na saúde animal e humana (EFSA, 2010).

A melamina terá começado a ser notificada no ano de 2003, em ovos e produtos derivados, através de contaminação. Contudo não foi possível quantificar essas mesmas notificações (RASFF, 2007).

Tabela 1.2 Número de notificações de melamina presentes no RASFF, sua classificação e respectivo ano das mesmas. Não há informação quanto ao número de notificações do ano de 2003 (Fonte: RASFF, 2017).

Ano das notificações	Número de notificações relativas à melamina	Classificação das notificações		
		Alerta	Rejeição na Fronteira	Informação
2003	Não há dados específicos	-----	-----	-----
2004	6	3	-----	3
2005	4	1	-----	3
2006	7	4	-----	3
2007	19	8	-----	11
2008	80	23	13	44
2009	30	10	7	13
2010	23	8	-----	15
2011	60	21	16	23
2012	48	7	17	24
2013	18	2	7	9
2014	28	1	12	15
2015	28	4	10	14
2016	18	1	7	10
2017-até dia 31 de Março	2	-----	1	1

1.4.1 PRINCIPAIS INCIDENTES ANTES DE 2008

Em 2003 foi detectada a presença de melamina em ovos e em carne de galinhas poedeiras. Este incidente resultou de um episódio de contaminação, uma vez que, a presença da melamina nesses alimentos se deveu à utilização da ciromazina como larvicida para regular o crescimento de insectos nas capoeiras. Deste modo, a ciromazina era administrada na ração das galinhas em doses de 0,5 ppm (0,5mg/kg), para evitar que as moscas colocassem os seus ovos no estrume (Chou *et al.*, 2003).

Nos Estados Unidos da América, entre os meses de Fevereiro e Março do ano de 2007 foram reportados numerosos casos de mortes e de doenças renais em animais de estimação, nomeadamente em cães e gatos. Após alguns estudos, as autoridades encontraram a fonte do problema e concluíram que o glúten de trigo vindo da China, utilizado na produção dos alimentos para animais, estaria contaminado com melamina e ácido cianúrico (Marín *et al.*, 2014). Mais tarde também foi encontrada melamina em concentrados de proteína de arroz e de milho provenientes da China. Os níveis de melamina encontrados em glúten de trigo e em concentrado de proteína de arroz variaram na gama de 0,2 a 8,0% (isto é de 2 a 80 g/ kg) (RASFF, 2007).

Apesar deste incidente ter causado um impacto inicial nos animais domésticos, o portal do RASFF, também possui 13 notificações da presença de melamina em quantidades que variam entre os 800 ppm e os 9500 ppm, em rações para animais produtores, sendo que quatro dessas notificações foram de alerta e nove de informação (RASFF, 2017).

Com o objectivo de acabar com este incidente, os Estados Membros foram convidados pela Comissão a controlar as remessas de glúten de trigo, proteína de milho, proteína de soja, concentrado de proteína de arroz e farelo de arroz, vindas de 30 países, particularmente as vindas da China (EFSA, 2010).

1.4.2 FRAUDE COM O LEITE EM PÓ ORIGINÁRIO DA CHINA E OUTROS INCIDENTES NO ANO DE 2008

O ano de 2008 foi o ano em que a presença de melamina nos alimentos originou o maior número de notificações RASFF e em maior número de categorias, como representado na **Figura 1.4** (RASFF, 2017). Nesse ano, a Comissão Europeia foi informada da presença de melamina, em níveis muito elevados para a saúde, em leite para crianças e em outros produtos lácteos vindos da China. A presença de melamina nestes géneros alimentícios deveu-se à sua adição para simulação do teor proteico, por motivos económicos. Este incidente registou pelo menos, a morte de seis crianças por insuficiência renal grave e mais de 200 000 casos de crianças afectadas por problemas renais, tendo sido desta forma, hospitalizadas mais de 50 000 crianças.

Apesar de não ser autorizada a importação de leite e produtos lácteos, incluindo leite em pó, oriundos da china, alguns produtos compostos pertencentes à categoria “Confeitaria”, como chocolate, bombons, biscoitos que contenham leite ou produtos lácteos, são importados da China para a UE. Alguns produtos compostos podem ter sido importados sem serem submetidos a controles de fronteira sistemáticos. Além disso, não pode ser excluída a existência de canais de importação especiais para esses produtos, destinados, por exemplo, a lojas de alimentos chinesas (EFSA, 2010). Assim, apesar da restrição anteriormente referida, a base de notificações do RASFF contemplou, no ano de 2008, três notificações de melamina em leite e em iogurtes importados ilegalmente da China, na Áustria, Eslováquia e Itália (RASFF, 2017).

A Agência de Inspeção Nacional da China detectou níveis de melamina que variavam entre os 0,09 e 2,56 mg/kg em diversos produtos lácteos. Entre as marcas internacionais afectadas estava a marca suíça Nestlé e a Dairy Farm UHT, em ambos os casos com produtos fabricados na China (Escobar *et al.*, 2010).

Além do enorme incidente da melamina no leite e nos seus produtos, o RASFF também registou nesse mesmo ano de 2008, notificações de contaminação com melamina em outras matrizes, tais como: aditivos alimentares (bicarbonato de amónio e carbonato de amónio); cereais e produtos de panificação (pó de feijão); suplementos dietéticos (isoflavonas de soja) e alimentação animal (RASFF, 2017).

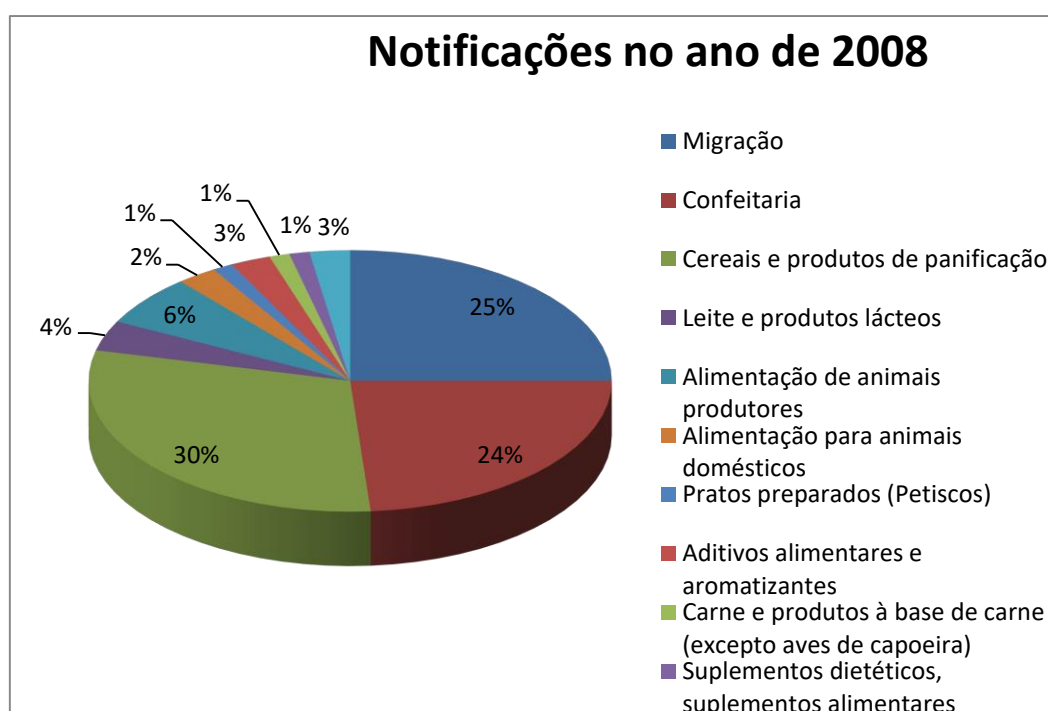


Figura 1.4: Contribuição percentual das várias categorias de produtos para o total de notificações de melamina no ano de 2008.

1.4.3 PRINCIPAIS INCIDENTES RELACIONADOS COM CONTAMINAÇÃO E MIGRAÇÃO APÓS O ANO DE 2008

Após o auge de incidentes ocorridos no ano de 2008, no ano de 2009 ocorreu um decréscimo significativo nas notificações (RASFF, 2009). Assim, em 2009, o número de notificações diminuiu para 30, tendo ocorrido maior incidência na categoria de “Migração” com 14 notificações, seguindo-se a categoria dos “Cereais e Produtos de Panificação” com cinco e a categoria de “Nozes, produtos com nozes e sementes” com quatro notificações (RASFF, 2017).

As notificações da presença da melamina em alimentos por migração, já aparecem desde o ano de 2004 até à actualidade, aliás a partir de 2010 à excepção dos anos de 2011 e 2012, os restantes anos apenas apresentaram notificações na categoria “Migração”. Contudo, estes incidentes não tiveram e não estão a ter o mesmo impacto na saúde que os incidentes por contaminação ou de origem fraudulenta.

No que diz respeito à categoria de “Cereais e Produtos de Panificação”, um dos géneros alimentícios que foi notificado por se encontrar como “não conforme” foi a bolacha de arroz. Já na categoria de “Nozes, produtos com nozes e sementes”, um outro exemplo de género alimentício “não conforme” foi o amendoim tostado (RASFF, 2017). A presença da melamina nestes géneros alimentícios ocorreu por contaminação, devida à ciromazina aplicada nessas culturas de cereais (EFSA, 2010). Também no ano de 2009, na categoria “Confeitaria”, registou-se apenas uma notificação classificada como “Rejeição na Fronteira”, em rebuçados vindos da China (RASFF, 2017).

1.5 LEGISLAÇÃO

Na sequência dos incidentes registados em 2007 e 2008 a Comissão Europeia elaborou a **Decisão 2008/757/EC de 26 de Setembro**, a qual determina que Os Estados-Membros devem proibir a importação de produtos compostos que contenham leite ou produtos lácteos, provenientes da China, destinados ao uso nutricional específico de lactentes e crianças jovens. Mais ainda, esta decisão impõe que todo e qualquer produto composto, vindo da China, que contenha pelo menos 15% de produtos lácteos, seja sistematicamente analisado antes de ser colocado no mercado europeu e que todos os produtos que apresentem um teor de melamina superior a 2,5 mg/kg sejam imediatamente destruídos (Decisão 2008/757/EC de 26 de Setembro).

Esta Decisão foi revogada pela **Decisão 2008/798/CE** de 14 de Outubro, que estende a obrigatoriedade de análise sistemática a todos os produtos compostos contendo produtos lácteos, incluindo os alimentos para animais, vindos da China (Branco, 2013; Decisão 2008/798/CE de 14 de Outubro). De seguida, a **Decisão 2008/921/CE de 9 de Dezembro**, altera a Decisão 2008/798/CE, e proíbe a importação para a Comunidade Europeia de produtos contendo leite ou produtos lácteos, soja ou produtos de soja destinados a uma alimentação especial de lactentes ou crianças jovens, vindos da China. Exige ainda que os Estados-Membros efectuem análises sistemáticas a todas as remessas oriundas da China de bicarbonato de amónio destinado à produção de géneros alimentícios e de alimentos para animais, assim como de géneros alimentícios e alimentos para animais contendo leite, produtos lácteos, soja ou produtos derivados de soja (Branco, 2013; Decisão 2008/921/CE de 9 de Dezembro).

O **Regulamento (CE) N° 1135/2009 da Comissão de 25 de Novembro** exige que as remessas vindas da China, que tenham que ser analisadas sistematicamente, passem a ser analisadas em 20%, devido à diminuição do número de notificações RASFF desde Janeiro de 2009. A qualquer outro

género alimentício ou alimento para animais com elevado teor proteico originário da China deverá ser efectuado um controlo aleatório para a pesquisa de melamina. Este Regulamento mantém ainda a proibição da importação para a Comunidade dos produtos referidos na Decisão 2008/921/CE, provenientes da China. O Regulamento diz ainda que uma vez que o nível de 2,5 mg/kg continua a ser adequado para fazer a distinção entre uma presença de melamina a um nível de base inevitável e uma adulteração inaceitável, qualquer dos produtos analisados que contenha um teor de melamina superior a 2,5 mg/kg deverá ser eliminado em condições de segurança de modo a evitar a sua entrada na cadeia alimentar e dos alimentos para animais (Regulamento (CE) Nº 1135/2009 de 25 de Novembro).

Em 2010, o Painel de peritos técnicos em Contaminantes da Cadeia Alimentar (CONTAM) em conjunto com o Painel dos Materiais em Contacto com géneros alimentícios, ambos da EFSA, elaboram um parecer científico relativo à melamina na alimentação humana e animal. As conclusões da EFSA mostram que a ingestão de melamina, mesmo em concentrações baixas como nos casos de contaminação, pode causar a formação de cristais no aparelho urinário e em alguns casos a morte. Tudo depende da extensão da exposição à melamina. Naturalmente que os grupos de risco são os lactentes, crianças e animais de estimação devido à sua baixa massa corporal (dados toxicológicos permitiram estabelecer uma TDI para a melamina de 0,2 mg/kg de massa corporal) (Branco, 2013).

Na sequência deste parecer a Comissão do *Codex Alimentarius* estabelece teores máximos de melamina na alimentação humana e animal. **O Regulamento (UE) Nº 594/2012 da Comissão de 5 de Julho** altera o **Regulamento (CE) Nº 1881/2006** aditando nele o teor máximo para o contaminante melamina nos géneros alimentícios e em fórmulas para lactentes de 2,5 mg/kg e de 1,0 mg/kg respectivamente e mais recentemente, o **Regulamento (UE) Nº 107/2013 da Comissão de 5 de Fevereiro**, estabelece o limite máximo de 2,5 mg/kg para a melamina em alimentos enlatados para animais de estimação (Branco, 2013; Regulamento (UE) Nº 107/2013 de 5 de Fevereiro).

No que diz respeito à ciromazina, nas plantas, este composto é rapidamente metabolizado, e o seu principal metabolito, a melamina, é encontrado em baixas concentrações (EFSA, 2010). Os Limites Máximos de Resíduos (LMR) actuais para a ciromazina são estabelecidos **no Regulamento (UE) 2016/1 da Comissão de 3 de Dezembro de 2015**. Para os usos aprovados, os LMR para a ciromazina estão na faixa de 0,05 mg/kg até 15 mg/kg (Regulamento (UE) 2016/1 de 3 de Dezembro de 2015). Segundo **Regulamento (UE) nº 594/2012 da Comissão de 5 de Julho de 2012**, o teor de melamina não deve exceder o teor de ciromazina legislado (LMR) de um determinado género alimentício (Regulamento (UE) nº 594/2012 de 5 de Julho de 2012).

Não é permitida a aplicação de ciromazina em animais em lactação que produzam leite para consumo. No entanto, o **Regulamento (UE) 2016/1 da Comissão de 3 de Dezembro de 2015** impõe LMR de ciromazina de 0,01 mg/kg no leite desses mesmos animais. Nos restantes animais, o LMR ao uso veterinário de ciromazina é de 0,3 mg/kg para os tecidos de ovinos e de 0,1 mg/kg para os tecidos

de suínos, caprinos equídeos, aves de capoeira e outros animais de criação terrestre (Regulamento (UE) 2016/1 de 3 de Dezembro de 2015).

1.6 AUTORIDADE DE SEGURANÇA ALIMENTAR E ECONÓMICA (ASAE)

A Autoridade de Segurança Alimentar e Económica é um serviço central da administração directa do Estado dotado de autonomia administrativa que foi criado em 2005, no âmbito do Programa do XVII Governo Constitucional da República Portuguesa, visando relançar a política da defesa dos consumidores.

A ASAE tem por missão a avaliação e comunicação dos riscos na cadeia alimentar, bem como a fiscalização e prevenção do cumprimento da legislação reguladora do exercício das actividades económicas nos sectores alimentar e não alimentar. Esta autoridade é um organismo nacional de ligação com outros Estados-Membros, destacando-se neste âmbito o papel de ponto focal da EFSA a nível nacional. No contexto do sector alimentar, a ASAE exerce funções de autoridade nacional de coordenação do controlo oficial dos géneros alimentícios, elaborando anualmente o Plano Nacional de Colheita de Amostras (PNCA). Este plano tem como objectivo assegurar e verificar que, os géneros alimentícios colocados no mercado não colocam em risco a vida e a saúde humana, através da verificação, mediante análise, da conformidade dos géneros alimentícios com a legislação comunitária (ASAE, 2017).

O departamento da ASAE, responsável pela elaboração e execução do PNCA, é o DRAL- Departamento de Riscos Alimentares e Laboratórios. São três as unidades laboratoriais incluídas neste departamento: Laboratório de Físico-Química (LFQ), Laboratório de Microbiologia (LM) e Laboratório de Bebidas e Produtos Vitivinícolas (LBPV). O conjunto dos três laboratórios, também denominado Laboratório de Segurança Alimentar (LSA), encontra-se acreditado, como Laboratório de Ensaio, pela Norma EN ISO/IEC 17025:2005 (IPAC, 2016).

Desde 2008 que a ASAE faz o controlo da melamina em géneros alimentícios e entre 2009 e 2013 este encontrava-se incluído no PNCA, coordenado pela ASAE (Branco, 2013). Após o ano de 2013 as análises de melamina tornaram-se mais esporádicas devido à verificação das práticas não fraudulentas relacionadas com a adição dolosa de melamina em géneros alimentícios.

Desde o ano de 2008 até ao final do mês de Fevereiro de 2013 foram analisadas 372 amostras, para determinação de melamina, como descrito na **Tabela 1.3**. Deste número total de amostras analisadas, quatro eram amostras não conformes, sendo uma amostra do ano de 2008 e as restantes três amostras do ano de 2009 (Branco, 2013).

Tabela 1.3: Número de amostras analisadas para determinação de melamina, por ano, pela ASAE, no período de 2008 até final de Fevereiro de 2013 (Branco, 2013).

Ano	Número de amostras analisadas
2008	71
2009	68
2010	27
2011	57
2012	115
2013	34
Total (Período 2008-Fevereiro de 2013)	372

No período temporal analisado, as amostras colhidas eram oriundas de vários países, principalmente da China, de Portugal, da União Europeia, da Espanha e da Bélgica (Branco, 2013), como se pode observar no gráfico da **Figura 1.5**.

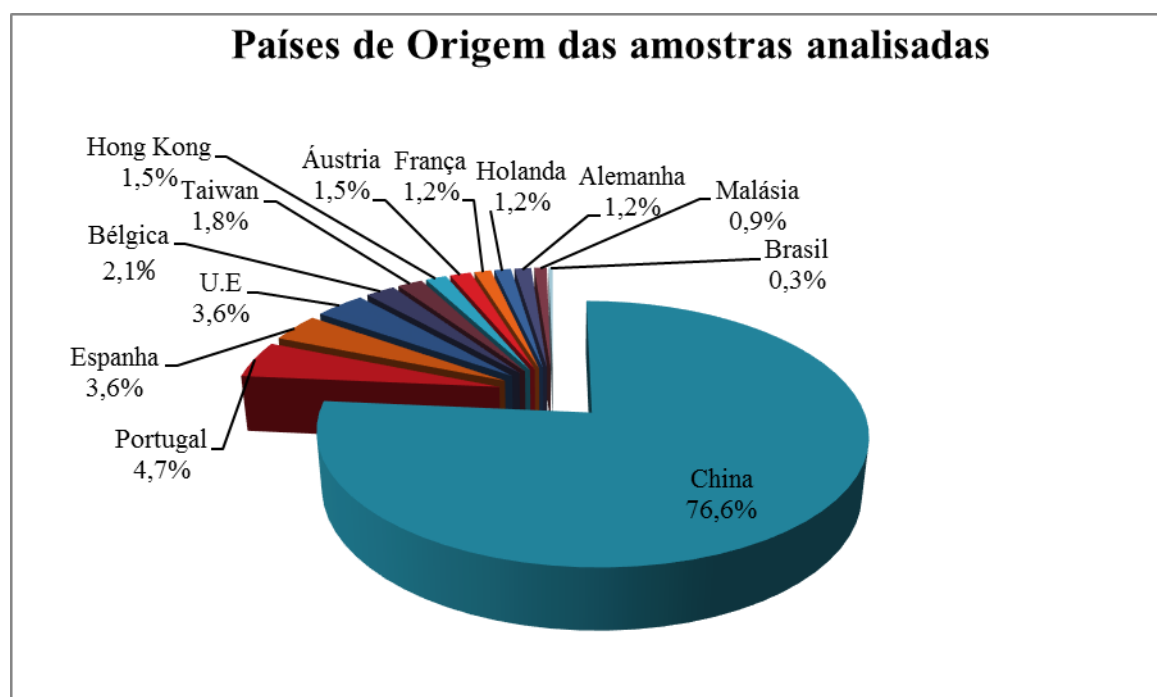


Figura 1.5: Distribuição percentual das amostras analisadas (para controlo da melamina) pelos respectivos países de origem, no período compreendido entre 2008 e Fevereiro de 2013. (Branco, 2013).

Após o auge de mortes na China devido ao incidente com o leite fraudulento, a maioria das amostras a serem analisadas foram leite ou géneros alimentícios que fossem compostos por leite (Branco, 2013), como evidencia a **Tabela 1.4**.

Tabela 1.4: Número de amostras analisadas e respectivo grupo de géneros alimentícios (Branco, 2013).

Grupos de géneros alimentícios	Número de Amostras
Leites/Bebidas	82
Leite em pó	11
Leite condensado	24
Leite evaporado	4
Leite UHT	1
Bebida láctea/ Soja	42
Bolachas e Biscoitos	99
Lácteos	94
de/com soja	5
Sobremesas	26
Lácteas	8
de/com soja	14
Gelatinas	4
Aperitivos/ Snacks	31
Lácteos	8
de/com soja	23
Refeições à base de soja	13
Rebuçados lácteos	29
Pão de leite	9
Ovos	2
Outros produtos de/com soja	44
Preparado de soja em pó para bebida	9
Bebida de soja	24
Molho de/com soja	11
Alimentação Animal	3
Matérias-primas	2
Alimentos compostos	1
Total (período 2008-2012)	338

1.7 MÉTODOS DE DETECÇÃO E/OU QUANTIFICAÇÃO DE MELAMINA

Vários métodos têm sido desenvolvidos para a análise de melamina em diferentes matrizes. Estes incluem métodos qualitativos e métodos quantitativos. Para a implementação da metodologia de detecção e quantificação de melamina, o método utilizado no presente trabalho, foi a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

1.7.1. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

O método ELISA é um método imunológico que se caracteriza por ser um método tanto qualitativo como quantitativo. A sua principal característica de funcionamento é o facto de ser muito específico na reacção anticorpo-antígeno (Escobar *et al.*, 2010).

Os *kits* de reagentes deste método encontram-se comercialmente disponíveis e são uma ferramenta de rastreio adequada (Escobar *et al.*, 2010). No entanto, estes são de alto custo, inviabilizando análises de rotina (Nascimento, 2014). Este método habitualmente só analisa leites, glúten de trigo e alimentação para animais de estimação, uma vez que não é adequado para outras matrizes (Escobar *et al.*, 2010).

1.7.2. Imunoensaio enzimático (EIA)

O método EIA foi desenvolvido como ferramenta de triagem simples, sensível e conveniente para a melamina. Este método consiste na reacção anticorpo-antígeno. Segundo Kim (2009), o *kit* EIA foi avaliado em relação a outros métodos analíticos, como o método HPLC-DAD e concluiu-se que o *kit* EIA é uma alternativa rápida e barata para quantificar a melamina em amostras de alimentos para animais de estimação. No entanto, em relação a outras matrizes também é pouco sensível tal como o método ELISA.

1.7.3. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O método FTIR consiste numa espectroscopia na região do infravermelho que por sua vez, estuda a interacção entre a radiação e a matéria com o objectivo de avaliar as ligações químicas. A técnica consiste na incidência de energia electromagnética sobre a molécula, a qual, de acordo com a variação do momento dipolar eléctrico, adquire movimento vibracional e origina os espectros. A espectroscopia na região do infravermelho é bem difundida em análise de alimentos e diversas pesquisas foram desenvolvidas com o intuito de identificar, quantificar ou avaliar a qualidade de alimentos.

Segundo Almeida (2013), a espectroscopia de infravermelho é uma ferramenta bastante eficaz para detectar melamina em produtos lácteos, como leites infantis, leites em pó e líquido, comportando-se como um método rápido, sensível e de baixo custo para análises de produtos lácteos. Contudo, este método, é pouco selectivo para outras matrizes.

1.7.4. Electroforese Capilar (CE)

A electroforese capilar consiste na migração diferencial de compostos neutros, iónicos ou ionizáveis num campo eléctrico (Fukuji, 2011).

Esta técnica tem sido utilizada como um método eficaz para a análise de melamina e compostos análogos em alimentos. Em comparação com outros métodos de cromatografia, a CE possui algumas vantagens, tais como a elevada eficiência de separação, elevada velocidade e baixo consumo de solvente e de amostra. Contudo tem como principal desvantagem a baixa sensibilidade (Wu & Zhang, 2013).

1.7.5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Na técnica de HPLC os componentes (ou analitos) são, primeiramente, dissolvidos num solvente, sendo depois forçados a percorrer uma coluna cromatográfica através da aplicação de pressões elevadas. Durante o processo cromatográfico, as moléculas da amostra são arrastadas pela fase móvel ao longo da fase estacionária. Neste trajecto as moléculas individuais da amostra ficam sujeitas a várias interacções: individualmente umas em relação às outras e entre estas e os componentes das fases móvel e estacionária, o que ocasiona a sua retardação no interior da coluna. Esta retardação é selectiva o que quer dizer que com um dado sistema de fases móvel/estacionária, a retardação é diferente de componente para componente. Os componentes separados são recolhidos à saída da coluna através de um dispositivo, o detector, que é sensível a uma propriedade do analito e “visualiza” a separação que ocorreu dentro da coluna. Esta técnica é muito versátil pois pode conjugar vários tipos de colunas e vários tipos de detectores, de acordo com as substâncias em análise.

Para análise do composto melamina, as fases estacionárias mais utilizadas são as de Ciano (CN) e as menos utilizadas as de Hidrocarbonetos (RP-18 e C-18). Quanto aos detectores, várias referências bibliográficas referem o uso de detectores Ultravioleta/Visível (UV/Vis) simples ou de fotodíodos (PDA), para métodos de análise quer da melamina quer dos seus compostos análogos.

1.7.6. Cromatografia Gasosa (GC)

O método de cromatografia gasosa consiste, tal como descrito no HPLC, na separação de compostos numa mistura. Contudo, caracteriza-se por ser aplicável para separação e análise de misturas cujos constituintes tenham pontos de ebulição até 300 °C e que sejam termicamente estáveis (Branco, 2013).

Kim (2009), refere que Bardalaye et al. (1987) testou este método com a ciromazina e a melamina, em amostras de repolho chinês, obtendo bons resultados. Contudo, salienta que esta técnica exigiu uma preparação extensiva da amostra, referindo ainda que, uma vez que a melamina não é volátil mas sim solúvel em solventes aquosos (ácidos ou básicos), a técnica de HPLC é uma escolha mais eficaz para a análise da mesma.

1.7.7. Técnicas acopladas à Espectrometria de Massa (MS)

A espectrometria de massa (MS) baseia-se na geração de iões gasosos e posterior separação de acordo com a razão massa/carga (m/z), sendo possível obter informações específicas a respeito do analito, através do seu perfil de fragmentação que lhe é característico. Esta técnica é muito utilizada hifenada com a cromatografia líquida (LC-MS) ou gasosa (GC-MS). A primeira utiliza normalmente, como fontes de ionização, a ionização por Eletrospray (ESI) e a ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI), ambas à pressão atmosférica; a ionização por ionização de electrões (EI) e a ionização química (CI), usadas em GC-MS, trabalham sob vácuo.

Apesar do LC-MS ser eficiente e de originar bons resultados para uma grande quantidade de analitos, incluindo a melamina, é uma técnica de custo muito elevado, não estando ao alcance de todos os laboratórios.

1.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Um método de ensaio é um processo que envolve manipulações susceptíveis de acumularem erros (sistemáticos e/ou aleatórios), podendo assim, em algumas situações, alterar de forma significativa o valor do resultado final. Por isso, é fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objectivos, para demonstrarem, através da validação, que os métodos internos de ensaio que executam conduzem a resultados credíveis e adequados à qualidade pretendida (Relacre, 2000). Desta forma, será necessário proceder à validação do método nos seguintes parâmetros: Especificidade/Selectividade; Curva de calibração (gama de trabalho, linearidade e limiares analíticos); Limites do Método; Precisão (repetibilidade, precisão intermédia); Exactidão.

➤ Especificidade/Selectividade

A especificidade é o primeiro parâmetro a ter em consideração na validação de um método analítico. Um método é considerado específico quando discrimina o analito relativamente a outros compostos eventualmente presentes na amostra a analisar (interferentes), ou seja, quando oferece a garantia que a grandeza detectada tem origem apenas no analito. Uma vez obtida a especificidade adequada, as condições experimentais estabelecidas – tipo de coluna, composição da fase móvel, fluxo, modo de detecção, etc. – passam a constituir um conjunto fixo de parâmetros a ser utilizado nos ensaios subsequentes (Branco, 2012).

➤ Curva de calibração (linearidade, gama de trabalho e limiares analíticos)

A linearidade de um método analítico é a sua capacidade de obter respostas do detector directamente proporcionais à concentração do analito nas soluções padrão/amostra, dentro de uma

determinada gama de trabalho. O estudo deste parâmetro deve permitir estabelecer a gama de concentrações dos padrões a utilizar nos estudos subsequentes (Relacre, 2000).

A gama de trabalho de um método de ensaio define-se como sendo o intervalo entre a concentração mais baixa e a concentração mais alta, para o qual se verifica ser possível a quantificação do analito com a linearidade exigida, sob as condições especificadas para o ensaio.

Finalmente, os limiares analíticos de um método de ensaio consistem no limite de detecção (LD) e no limite de quantificação (LQ). O limite de quantificação corresponde à concentração mais baixa de analito que pode ser quantificada com razoável exactidão e precisão. Quando o método analítico envolve a utilização da calibração linear, o limite de quantificação (**Equação 1.1**) é calculado através do desvio padrão residual da curva de calibração, de acordo com a **Equação 1.2**.

Na curva de calibração, o limite de quantificação corresponde normalmente ao padrão de menor concentração (excluindo o branco). Este limiar, após ter sido determinado teoricamente, deve ser verificado experimentalmente para averiguar se a exactidão e precisão conseguidas são satisfatórias. Este teste pode ser realizado através da reanálise, em condições de precisão intermédia, de uma série de padrões, cuja concentração seja próxima ou igual ao limite de quantificação (Relacre, 2000).

$$LQ = \frac{10 \times Sy/x}{b}$$

Equação (1.1)

Em que:

$$Sy/x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [yi - (a + b \times xi)]^2}{N - 2}}$$

Equação (1.2)

Onde:

Sy/x – Desvio padrão residual da curva de calibração;

xi – Valores de x (concentração dos padrões utilizados);

yi – Valores de y (sinal instrumental);

a – Ordenada na origem da curva de calibração;

b – Declive da curva de calibração;

N – Número de padrões utilizados.

O limite de detecção corresponde ao teor mínimo medido, a partir do qual é possível detectar a presença do analito com uma certeza estatística razoável. Este limiar analítico corresponde à mais pequena quantidade de substância a analisar que pode ser detectada numa amostra, mas não necessariamente quantificada como valor exacto. Uma leitura inferior ao limite de detecção não significa, obviamente, a ausência do analito a medir. Apenas se pode afirmar, com uma razoável probabilidade, que a concentração do analito, a existir, será inferior a um certo valor (LD) (Relacre, 2000). Em termos práticos, o limite de detecção corresponde à concentração mínima do analito cujo sinal é possível distinguir da matriz branca (amostra que contém a mesma matriz mas não contém o analito e portanto apresenta uma ausência de sinal).

Convencionou-se que o LD corresponde a 1/3 do valor do LQ, ou seja, aproximadamente dado pela **Equação 1.3**.

$$LD = \frac{3 \times Sy/x}{b}$$

Equação (1.3)

Onde:

Sy/x – Desvio padrão residual da curva de calibração;

b – Declive da curva de calibração;

➤ Precisão

A precisão é um termo geral que pretende avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. É importante salientar que será mais realista estudar preferencialmente a precisão sobre amostras, para contemplar efeitos de matriz. Existem duas medidas extremas para avaliar esta dispersão de resultados, designadas por repetibilidade (r) (análise sobre uma mesma amostra no mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo equipamento e mesmo tipo de reagentes) e reprodutibilidade (R), ou reprodutibilidade interlaboratorial, (análise sobre uma mesma amostra em diferentes laboratórios, diferentes operadores, diferentes equipamentos, épocas diferentes de análise) (Relacre, 2000). Existe ainda a precisão intermédia, ou reprodutibilidade intralaboratorial, para um método que se caracteriza por variar pelo menos um dos factores descritos na repetibilidade (ex. vários analistas, análise da mesma amostra em tempos diferentes, etc.) (ISO 5725;1994).

Verificação da precisão do método

O LFQ utiliza como critério para definir o limite de aceitação da precisão do método, o desvio padrão relativo obtido em condições de reprodutibilidade (%RSD_R) dado pela equação de Horwitz (QPA-58, 2011). Esta equação expressa uma relação exponencial entre o desvio padrão relativo de Reprodutibilidade e a concentração (**Equação 1.4**). A equação de Horwitz é uma equação empírica, que apenas depende da concentração e que se considera independente do analito, da matriz ou do método de análise.

$$\% RSD_{R\text{Horwitz}} = 2^{(1-0.5\log C)}$$

Equação (1.4)

Onde:

RSD_R - desvio padrão relativo obtido em condições de reprodutibilidade;

C - concentração expressa em fracção mássica

A concentração expressa em fracção mássica obtém-se multiplicando a concentração por um factor adequado. Este factor depende das unidades em que a concentração está expressa (**Tabela 1.5**).

Tabela 1.5: Factor de conversão para fracção mássica.

Unidades de concentração	Factor de conversão para fracção mássica
%	10 ⁻²
g/kg ou g/L	10 ⁻³
mg/kg ou mg/L	10 ⁻⁶
µg/kg ou µg/L	10 ⁻⁹

➤ **Exactidão**

A exactidão é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro (ISO 5725;1994)

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exactidão de uma metodologia são, entre outros, os seguintes:

Ensaio de Recuperação

O valor da recuperação da amostra é dado através da seguinte equação:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{C_R - C_A}{C_P} \times 100$$

Equação (1.5)

Onde:

C_R – Concentração do analito na amostra fortificada;

C_A – Concentração do analito na amostra não fortificada;

C_P – Concentração do padrão utilizado para fortificar a amostra.

Cálculo do z-score num material de referência (MR)

A pontuação -score deste MR foi calculada através da **Equação 1.6**.

$$z_{score} = \frac{(X_{lab} - X_v)}{\sigma_p}$$

Equação (1.6)

Em que:

- X_{lab} -Valor obtido no ensaio;
- X_v - Valor aceite como verdadeiro, isto é, o estabelecido pela entidade organizadora (FAPAS);
- σ_p - Desvio padrão do estudo interlaboratorial.

A avaliação pode ser feita segundo a seguinte escala de pontuação (Relacre, 2000):

- $|Z| \leq 2$: Satisfatório
- $2 < |Z| \leq 3$: Questionável
- $|Z| > 3$: Incorrecto

1.9 ENQUADRAMENTO E OBJECTIVOS DO TRABALHO

Incidentes relacionados com adição fraudulenta de melamina a géneros alimentícios, como os ocorridos no passado recente, poderão voltar a verificar-se no futuro próximo devido à crescente necessidade de fontes proteicas. Por outro lado, o uso extensivo na agricultura de pesticidas como a ciromazina, não terá tendência a abrandar nos próximos anos, pelo que a contaminação de géneros alimentícios com melamina, por esta via, tenderá a aumentar. Assim, surge a necessidade de implementar métodos expeditos de análise de melamina em alimentos que permitam responder à necessidade de efectuar o controlo em rotina deste contaminante nos géneros alimentícios.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objectivo a implementação de um método de detecção e quantificação de melamina em alimentos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e a sua validação em cinco matrizes críticas para este tipo de contaminação/adulteração: leite sem lactose, ovos, bebida de soja, rebuçados de leite e bolachas de arroz.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. REAGENTES

Acetonitrilo (ACN) (CH_3CN), grau HPLC de gradiente, pureza $\geq 99,9\%$, CAS 75-05-8, lote nº 412392000; Ácido fórmico (CHOOH), grau puríssimo.p.a., pureza $\geq 98\%$, CAS 64-18-6; Ácido trifluoroacético (TFA) RPE (CF_3COOH), CAS 76-05-1, grau de pureza $\geq 99,9\%$; Dihidrogenofosfato de sódio monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), grau p.a., pureza 99,0-102,0%, CAS 7722-88-5, lote nº 106A554646; Etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), grau HPLC, pureza $\geq 99\%$, CAS 64-17-9; Formiato de amônio (NH_4CHOO), grau p.a., pureza $> 97\%$, CAS 540-69-2, lote nº 0001399796; Hidróxido de amônio (NH_4OH) a 33%, grau puríssimo.p.a., pureza $\geq 98\%$, CAS 1336-21-6; Hidróxido de sódio (NaOH), grau p.a., pureza $\geq 99\%$, CAS 8012-01-9; Melamina (2,4,5-triamino-1,3,5-triazina- $\text{C}_3\text{H}_6\text{N}_6$), grau de A.C.S., pureza $> 99\%$, CAS108-78-1; lote nº 2036154; Metanol (CH_3OH), grau HPLC de gradiente, pureza $\geq 99,9\%$, CAS 67-56-1. A água utilizada foi água desionizada extraída de um sistema Academic+RiOs da Millipore, condutância $\leq 0,054 \mu\text{S}$.

2.2. MÉTODOS DE HPLC UTILIZADOS NOS ENSAIOS PRELIMINARES

Na primeira parte deste trabalho testaram-se três diferentes métodos de HPLC para detecção da melamina em Brancos de Procedimento e em matrizes alimentares, fortificados a 2,5 mg/kg. Os métodos testados foram: Método I-MM Luna; Método II-MM Biopharm; Método III-MM Agilent.

2.2.1 Preparação das soluções padrão de melamina

As soluções de melamina têm estabilidade de um mês quando conservadas a cerca de 4 °C, no frigorífico e ao abrigo da luz.

✓ Solução mãe de melamina de 1 mg/mL

Para preparar esta solução pesaram-se 10 mg de melamina (balança analítica calibrada com resolução de 0,1 mg, Mettler, modelo AB204), para um balão volumétrico de 10 mL, dissolveu-se com uma mistura de NaOH 0,05 M: Etanol 1:1 (v/v) e aferiu-se com o mesmo solvente. Revestiu-se o balão com folha de alumínio e conservou-se no frigorífico (4° C).

✓ Solução stock de melamina de 100 µg/mL

Para preparar esta solução pipetaram-se 2000 µL de solução mãe de melamina para um balão de 20 mL, aferiu-se com água desionizada e homogeneizou-se. Revestiu-se o balão com folha de alumínio e conservou-se no frigorífico (4° C).

✓ **Soluções padrão de trabalho de melamina (Curvas de Calibração)**

As soluções padrão de trabalho foram preparadas a partir da solução stock de melamina de 100 µg/mL (**Tabela 2.1**). Os vários balões foram aferidos com água desionizada, nos Método MM I-LUNA e Método MM II- Biopharm, e no método MM III-Agilent foram aferidos com a mistura ACN: solução aquosa NH₄CHOO (40:10; v/v). Os balões foram revestidos com folha de alumínio e conservados em frigorífico.

Tabela 2.1:Preparação das várias soluções padrão de melamina utilizados para a curva de calibração.

Concentração ng/mL	Volume de Balão (mL)	Volume da solução stock (µL)
25	50	12,5
50	20	10
100	20	20
250	10	25
500	20	100
1000 ¹	20	200
2500 ¹	20	500
5000 ¹	20	

✓ **Solução padrão controlo de melamina a 100 ng/mL, especificamente para o nível de fortificação a 2,5 mg/kg no Método I-MM Luna**

Esta solução foi preparada da mesma forma descrita para o padrão 100 ng/mL da curva de calibração.

✓ **Solução padrão controlo de melamina a 250 ng/mL, especificamente para o nível de fortificação a 2,5 mg/kg no Método II-MM Biopharm**

Esta solução foi preparada pipetando 25 µL da solução stock de melamina para um balão de 10 mL, tendo-se posteriormente aferido o volume com água desionizada. O balão foi então revestido com folha de alumínio e conservado em frigorífico.

✓ **Solução padrão controlo de melamina a 1000 ng/mL, especificamente para o nível de fortificação a 2,5 mg/kg no Método III-MM Agilent**

Esta solução foi preparada pipetando 200 µL da solução stock de melamina para um balão de 20 mL, tendo-se posteriormente aferido o volume com mistura ACN: solução aquosa NH₄CHOO (40:10; v/v). O balão foi então revestido com folha de alumínio e conservado em frigorífico.

¹ Padrões utilizados para a curva de calibração do método **MM III-Agilent**.

✓ **Solução padrão de 5000 ng/mL para uma fortificação das matrizes, a 2,5 mg/kg nos Método I-MM Luna, Método II-MM Biopharm e no Método III-MM Agilent**

Para preparar esta solução pipetaram-se 2500 µL da solução stock de melamina para um balão de 50 mL, aferiu-se com água desionizada e homogeneizou-se. O balão foi revestido com folha de alumínio e conservado em frigorífico. Para o método III esta solução foi preparada da mesma forma mas utilizando uma mistura ACN: solução aquosa de NH_4CHOO (40:10; v/v) em vez da água desionizada.

2.2.2. Método I- MM Luna

O método I-MM Luna foi adaptado de Muñiz-Valencia et al. (2008). Para preparação das amostras pesaram-se 2 g (balança analítica calibrada com resolução de 0,1 mg, Mettler, modelo AB204) da amostra previamente homogeneizada para erlenmeyers de 100 mL. Seguidamente, para as amostras fortificadas, adicionou-se o volume de solução padrão de melamina de concentração conhecida necessário para atingir o nível de fortificação pretendido. As amostras não fortificadas foram preparadas da mesma forma mas substituindo o volume de solução padrão de melamina por idêntico volume de água desionizada. Os erlenmeyers foram rolhados e colocados sob agitação durante 30 minutos (Placas de agitação magnéticas revestidas com teflon, *Yellowline*). Em seguida adicionou-se a cada erlenmeyer 49 mL de solução de extracção ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5 mM, pH 5,00) e realizou-se a extracção colocando o erlenmeyer rolhado no banho de ultrassons durante 20 minutos (Banho de ultrassons com temporizador, Grant;). Após a extracção transferiu-se 20 mL de extracto para um tubo de centrifuga e centrifugou-se a 21 000 r.p.m. e 18 °C durante 50 minutos (Centrífuga *SIGMA*, 3K30). Após centrifugação filtraram-se cerca de 2 mL do sobrenadante com filtro de seringa de *nylon* de 0,2 µm de porosidade e 13 mm de diâmetro (*PALL Life Sciences*), transferiu-se o filtrado para um *vial* e colocou-se o mesmo no amostrador automático do cromatógrafo. Finalmente injectaram-se 20 µL num Cromatógrafo *Waters* equipado com sistema de gestão de solventes Alliance2695, bomba quaternária, degaseificador, amostrador automático, forno de colunas, detector de fotodíodos 996 (DAD) e sistema de aquisição e tratamento de dados Millennium. As condições cromatográficas seleccionadas para a implementação deste método estão apresentadas na **Tabela 2.2**.

Tabela 2.2: Condições cromatográficas seleccionadas para o Método I- MM LUNA

Coluna	Luna CN (Phenomenex) (250x4,6 mm, 5 µm de tamanho de partícula) (coluna com tratamento <i>endcapping</i>);
Pré-coluna	Luna CN (Phenomenex) (4x3mm, 5 µm de tamanho de partícula)
Fase móvel	Eluição isocrática de solução aquosa de Dihidrogenofosfato de sódio (NaH ₂ PO ₄) 5mM, ajustada a pH 5 e filtrada (filtro PP hidrófilo com 47 mm e 0,2 µm de porosidade (<i>PALL Life Sciences</i>)).
Fluxo	1mL/minuto
Deteção	UV-DAD a 210 nm (varrimentos entre 190 e 600 nm)
Volume de injeção	20 µL
Temperatura do forno de colunas	30°C/50°C
Tempo de análise	30 Minutos

2.2.3. Método II-MM Biopharm

No método II-MM Biopharm utilizaram-se colunas de extracção em fase sólida (SPE) específicas para o isolamento da melamina (Biopharm *Melamine Clea-up Column*, *Product Code*: P 111) tendo-se seguido o protocolo recomendado pelo fabricante (Biopharm, s.d). Para preparação das amostras pesou-se 1 g (balança analítica calibrada com resolução de 0,1 mg, Mettler, modelo AB204) da amostra previamente homogeneizada para erlenmeyers de 100 mL. Seguidamente, para as amostras fortificadas, adicionou-se o volume de solução padrão de melamina de concentração conhecida necessário para atingir o nível de fortificação pretendido. As amostras não fortificadas foram preparadas da mesma forma mas substituindo o volume de solução padrão de melamina por idêntico volume de água desionizada. Os erlenmeyers foram então rolhados e colocados em agitação durante 30 minutos (Placas de agitação magnéticas revestidas com teflon, *Yellowline*). Em seguida adicionou-se a cada erlenmeyer 9,5 mL de solução de extracção ACN 50% e colocou-se no banho de ultrassons (Banho de ultrassons com temporizador, Grant;) durante 30 minutos. Após a extracção transferiu-se o extracto para um tubo de centrífuga e centrifugou-se a 21 000 r.p.m. e 18 °C durante pelo menos 30 minutos (centrífuga *SIGMA*, 3K30). O sobrenadante foi recolhido e filtrado (filtro de papel com microfibras de vidro de 1,6 mm). Em seguida, colocaram-se 5 mL do filtrado em colunas de *clean-up* para melamina (Biopharm), recolheram-se 500 µL para um vial e evaporou-se à secura a 60 °C em N₂. Após a secagem redissolveu-se com 500 µL da fase móvel (NaH₂PO₄.H₂O, 5 mM e pH 5: ACN, 92:8,

v/v), agitou-se em vórtex (*Yellowline*) durante 20 segundos, transferiu-se para uma seringa e filtrou-se com filtro de nylon de 0,2 µm de porosidade e 13 mm de diâmetro (*PALL Life Sciences*) para um vial que posteriormente se colocou no amostrador automático do cromatógrafo. Finalmente injectou-se um volume de 50 µL (Cromatógrafo Waters equipado com sistema de gestão de solventes Alliance2695, bomba quaternária, degaseificador, amostrador automático, forno de colunas, detector de fotodíodos 996 (DAD) e sistema de aquisição e tratamento de dados Millennium). As condições cromatográficas seleccionadas para a realização deste método estão apresentadas na **Tabela 2.3**.

Tabela 2.3: Condições cromatográficas seleccionadas para o Método II.

Coluna	Purospher STAR RP 18 (LiChroCART) (250x 4 mm, 5 µm de tamanho de partícula)
Pré-coluna	Purospher STAR RP 18 (LiChroCART) (4 x 4 mm, 5 µm de tamanho de partícula)
Fase móvel	Eluição isocrática de solução aquosa de 92% NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O 5mM, pH 5: 8% ACN filtrada (filtro PP hidrófilo com 47 mm e 0,2 µm de porosidade (<i>PALL Life Sciences</i>)).
Fluxo	1mL/minuto
Deteção	UV-DAD a 210 nm (varrimentos entre 190 e 600 nm)
Volume de Injecção	50 µL
Temperatura do forno de colunas	30°C
Tempo de Análise	10 Minutos

2.2.4. Método III-MM Agilent

O método III-MM Agilent foi adaptado de Mi et al. (2008). Para preparação das amostras pesaram-se 2 g (balança analítica calibrada com resolução de 0,1 mg, Mettler, modelo AB204) da amostra previamente homogeneizada para um tubo de centrífuga. Seguidamente, para as amostras fortificadas, adicionou-se o volume de solução padrão de melamina de concentração conhecida necessário para atingir o nível de fortificação pretendido. As amostras não fortificadas foram preparadas da mesma forma mas substituindo o volume de solução padrão de melamina por idêntico volume de água desionizada. Em seguida, adicionaram-se 15 mL de solução aquosa de TFA a 5% e 4 mL de ACN e realizou-se a extracção em banho de ultrassons (Banho de ultrassons com temporizador, *Grant*) durante 10 minutos. Findo este tempo, agitou-se durante 10 minutos em vórtex (*Yellowline*) e centrifugou-se (centrífuga *SIGMA*, 3K30) a 10 000 r.p.m. e 18 °C durante 45 minutos. O sobrenadante foi recolhido, filtrado através de filtro de papel (Papel de filtro nº41 *ASHLESS*, *Whatman*, 12,5 cm)

para balões de 25 mL que foram aferidos com a solução de TFA 5%. Em seguida procedeu-se à etapa de *Clean-up*, utilizando colunas SPE SAMPLIQ SCX 50 x 6 mL, 150 mg (Agilent), de acordo com o procedimento descrito na **Figura 2.1**.

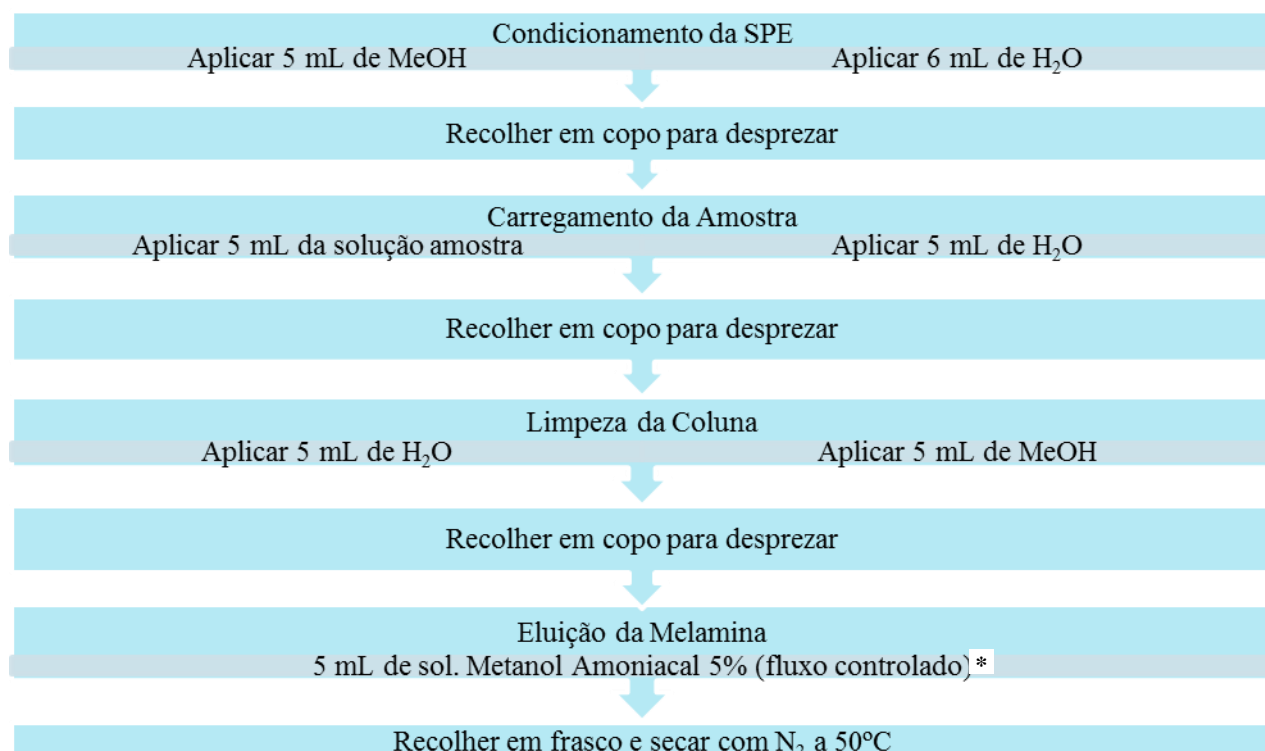


Figura 2.1: Procedimentos efectuados na etapa “*Clean-up*”. *) Solução 95% metanol : 5% hidróxido de amónio (v/v)

Após a secagem dissolveu-se o resíduo em 1 mL da fase móvel (ACN:NH₄CHOO 10 mM, pH3, 80:20, v/v), agitou-se em vórtex durante 1 minuto; transferiu-se o filtrado para uma seringa e filtrou-se com filtros de celulose regenerada de 0,2 µm (SPARTAN 13, Schleicher e Schuell) para um vial que, posteriormente, se colocou no amostrador automático. Finalmente injectou-se um volume de 10 µL (Cromatógrafo Waters equipado com sistema de gestão de solventes Alliance2695, bomba quaternária, desgaseificador, amostrador automático, forno de colunas, detector de fotodíodos 996 (DAD) e sistema de aquisição e tratamento de dados Millennium). As condições cromatográficas seleccionadas para a realização deste método estão apresentadas na **Tabela 2.4**. No método III a análise cromatográfica da matriz alimentar fortificada foi realizada em paralelo com duas colunas diferentes: A coluna Kinetex Hilic (Phenomenex), e a coluna Zic-Hilic (Merck) (Tabela 2.4).

Tabela 2.4: Condições cromatográficas seleccionadas para o Método III.

Colunas	Kinetex Hilic (50 x 2,10 mm, 2,6 µm de tamanho de partícula) (Phenomenex); Zic-Hilic (100 x 2,1 mm, 5 µm de tamanho de partícula) (Merck).
Pré-coluna	-----
Fase móvel	Eluição isocrática de solução aquosa de 80% ACN: 20% NH ₄ CHOO, 10 mM, pH 3.00 filtrada (filtro PP hidrófilo com 47 mm e 0,2 µm de porosidade (<i>PALL Life Sciences</i>)).
Fluxo	0,3 mL/minuto
Deteção	UV-DAD a 210 nm (varrimentos entre 190 e 600 nm)
Volume de Injecção	10 µL
Temperatura do forno de colunas	40°C
Tempo de Análise	10 Minutos

*) O pH da solução de formiato de amónia foi ajustado a pH 3,00 com ácido fórmico.

2.2.5 Controlo de Qualidade da Análise Cromatográfica

✓ Verificação do sistema cromatográfico

Nas condições do ensaio, a pressão do sistema deve situar-se entre 1100 e os 1400 psi. Se se verificar que o valor máximo é ultrapassado, deve proceder-se à substituição da(s) pré-coluna(s).

2.2.6. Pontos de Controlo do Método

✓ Verificação da curva de calibração

Em cada sequência de análise efectuou-se a verificação da curva de calibração com a injecção da solução de padrão de controlo (MM).

✓ Duplicados de amostra

Todas as amostras foram analisadas em duplicado.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. SELECÇÃO DO MÉTODO A ADOPTAR

Na primeira parte deste trabalho testaram-se três diferentes métodos (Método I-MM Luna; Método II-MM Biopharm e Método III-MM Agilent) para detecção da melamina em brancos de procedimento e em bolacha de arroz, fortificados a 2,5 mg/kg. A escolha do método a implementar foi feita com base em estudos de recuperação da melamina a partir dessas amostras. Para tal, as amostras fortificadas foram preparadas e, em seguida, submetidas aos procedimentos de extracção e de análise descritos para cada um dos três métodos em estudo (pontos 2.2.2. a 2.2.4.).

Antes de testar os brancos de procedimento e as matrizes alimentares fortificadas fizeram-se ensaios com a solução padrão de trabalho de melamina a 100 ng/mL. Estes ensaios permitiram, para cada um dos métodos, determinar o tempo de retenção do pico melamina, bem como a sua respectiva área. As **Figuras 3.1 e 3.2** mostram, respectivamente, o perfil cromatográfico e o espectro UV/Vis da solução padrão de melamina a 100 ng/mL obtidos nas condições do método I-MM Luna.

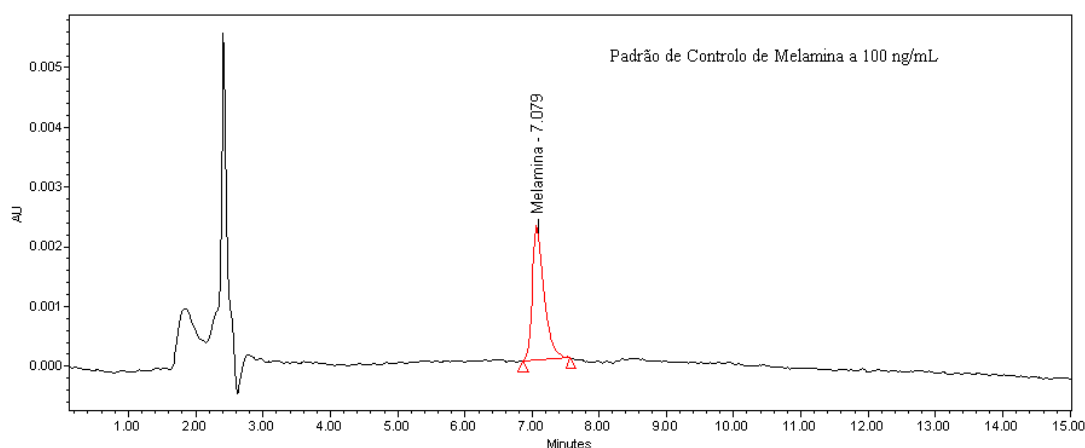


Figura 3.1: Perfil cromatográfico a 210 nm da solução padrão de melamina a 100 ng/mL (Método I-MM Luna)

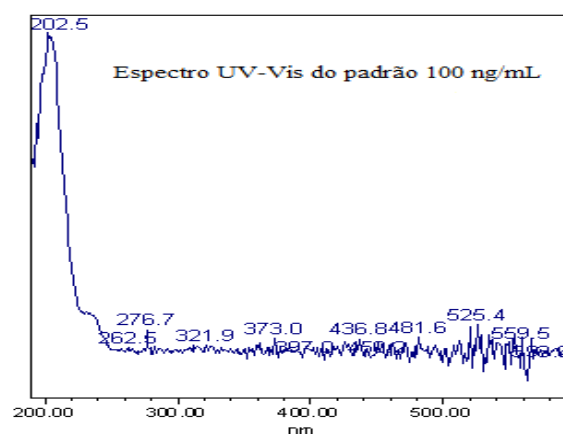


Figura 3.2: Espectro de UV/Vis da solução padrão de trabalho de melamina a 100 ng/mL.

As **Figuras 3.3 a 3.5** correspondem ao cromatograma, espectro UV/Vis e perfil de pureza respectivamente, do branco de procedimento fortificado nas condições do **Método I- MM Luna**. Os resultados mostraram que, com este método, foi possível identificar de forma clara, tanto nos cromatogramas dos brancos de procedimento fortificados como nos das amostras de bolacha de arroz fortificadas, um pico com tempo de retenção de 7,003 minutos, que apresentava um perfil de pureza elevado e um espectro UV/Vis característico da melamina.

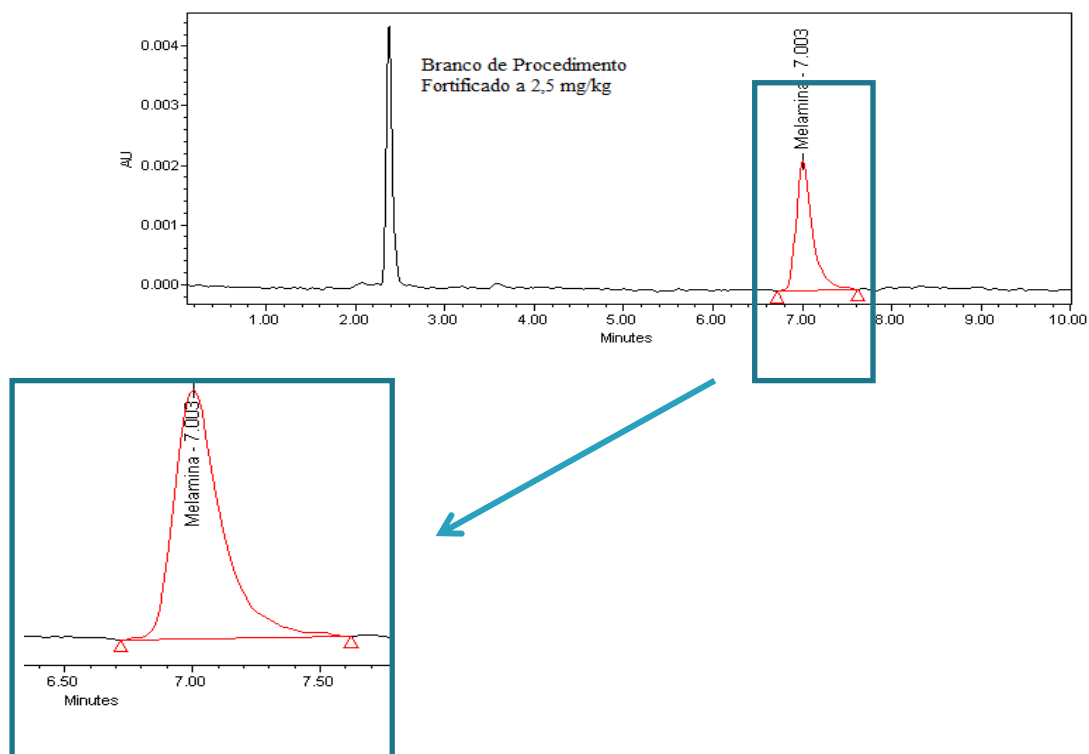


Figura 3.3: Perfil cromatográfico a 210 nm da solução do Branco de Procedimento Fortificada a 2,5 mg/kg (**Método I**).

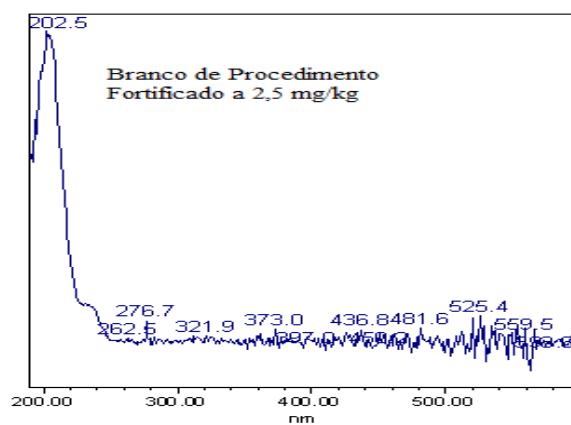


Figura 3.4: Espectro de UV/Vis da solução do Branco de Procedimento Fortificado a 2,5mg/kg (**Método I**).

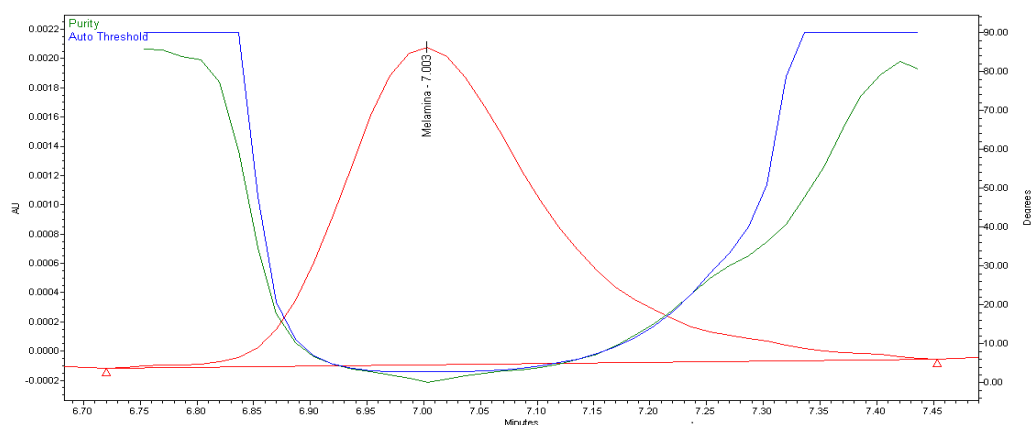


Figura 3.5: Perfil de pureza da solução do Branco de Procedimento Fortificado a 2,5 mg/kg (**Método I**).

As **Figuras 3.6 a 3.8** correspondem ao cromatograma, espectro UV/Vis e perfil de pureza respectivamente, do branco de procedimento fortificado a 2,5 mg/kg nas condições do **Método II-MM Biopharm**.

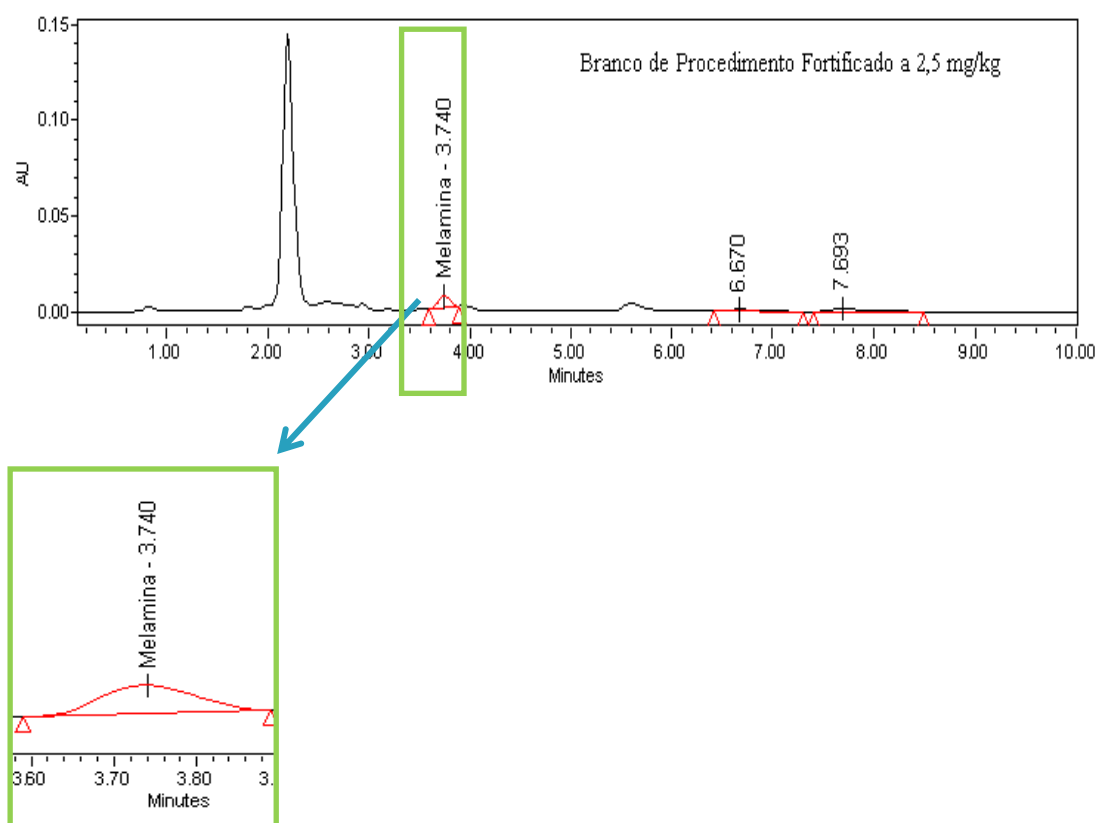


Figura 3.6: Perfil cromatográfico a 210 nm da solução do Branco de Procedimento Fortificada a 2,5 mg/kg, (**Método II**).

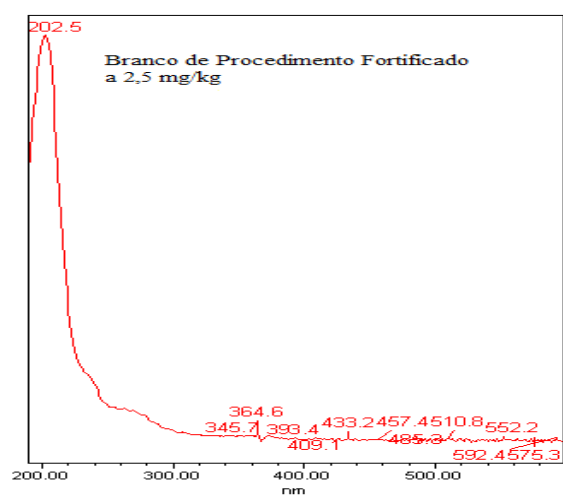


Figura 3.7: Espectro de UV/Vis da solução do Branco de Procedimento Fortificado a 2,5 mg/kg (**Método II**).

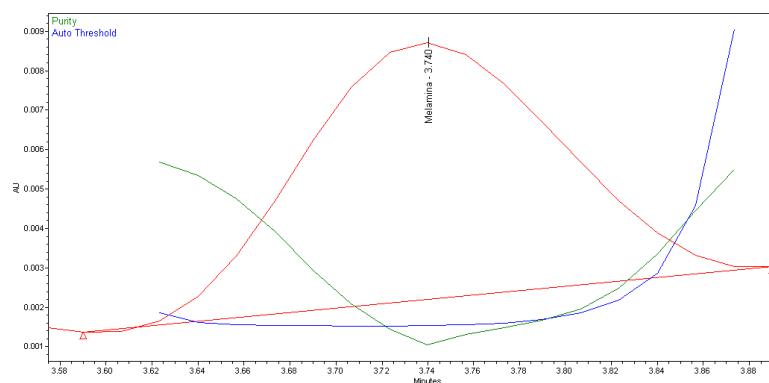


Figura 3.8: Perfil de pureza do Branco de Procedimento Fortificado a 2,5 mg/kg (**Método II**).

Como é possível verificar através na **Figura 3.6** as condições de extracção utilizadas no **método II-MM Biopharm** originaram uma grande perda de melamina. Com efeito, nos cromatogramas tanto do branco de procedimento fortificado, como das bolachas de arroz fortificadas, foi possível identificar a presença deste composto, contudo as áreas dos respectivos picos foram sempre muito reduzidas.

Por último, as **Figuras 3.9 a 3.11** correspondem ao cromatograma, espectro UV/Vis e perfil de pureza respectivamente, do branco de procedimento fortificado do **Método III- MM Agilent**.

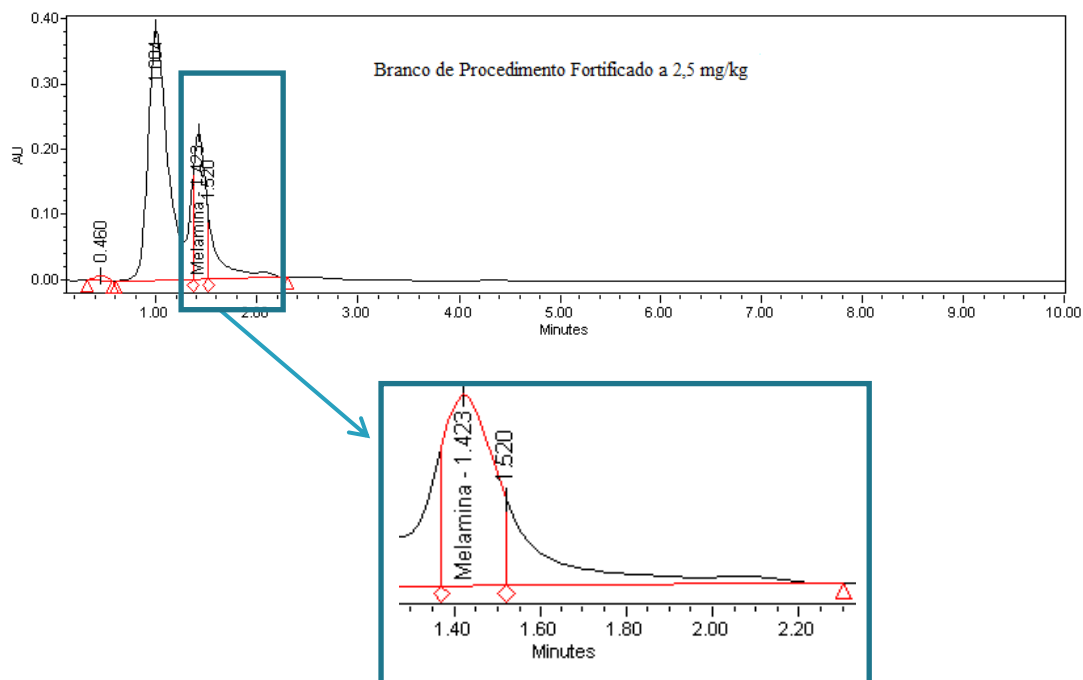


Figura 3.9: Perfil cromatográfico a 210 nm da solução do Branco de Procedimento Fortificada a 2,5 mg/kg, (**Método III**).

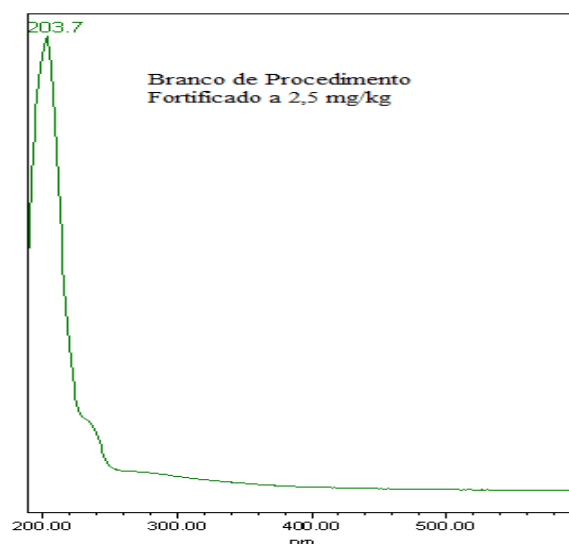


Figura 3.10: Espectro de UV/Vis da solução do Branco de Procedimento Fortificado a 2,5 mg/kg (**Método III**).

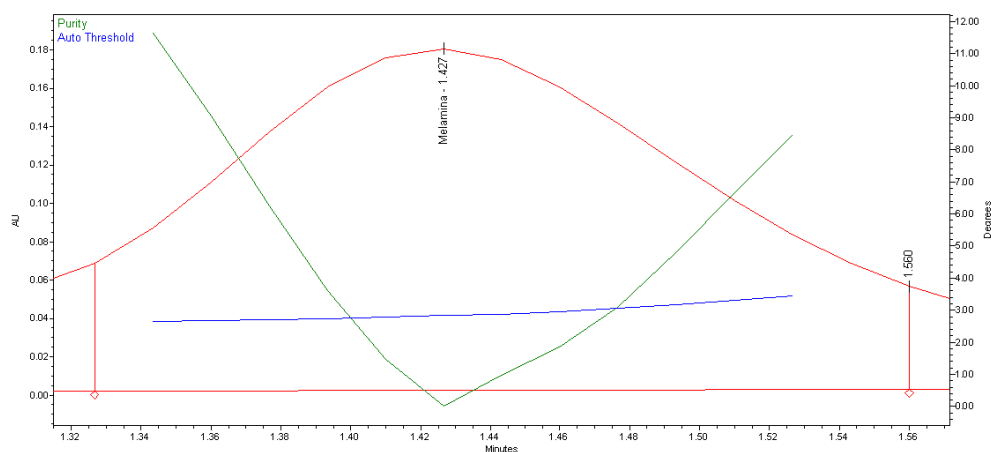


Figura 3.11: Perfil de pureza do Branco de Procedimento Fortificado a 2,5 mg/kg (**Método III**).

Os resultados mostraram que com o **método III-MM Agilent** não foi possível obter uma separação satisfatória da melamina. A realização de uma corrida com a fase móvel (**Figura 3.12**) permitiu verificar que os picos do solvente se sobrepõem ao pico da melamina. Idêntico perfil foi obtido quando se realizou a análise com a bolacha de arroz fortificada. O **Método III** foi adaptado a partir de um método desenvolvido para ser utilizado em LC-MS pelo que usa uma fase móvel que, não tendo interferência no MS, interfere fortemente na especificidade da melamina no HPLC com detecção UV/Vis (ver **Figura 3.12**). De referir que foram efectuadas várias alterações, em relação ao método pesquisado originalmente, na tentativa de eliminar a interferência descrita. Assim, as bolachas de arroz fortificadas foram analisadas utilizando diferentes colunas (Kinetex Hilic e Zin-Hilic).

Contudo, com este método não se conseguiu distinguir a melamina dos interferentes, mesmo alterando a selectividade da fase estacionária.

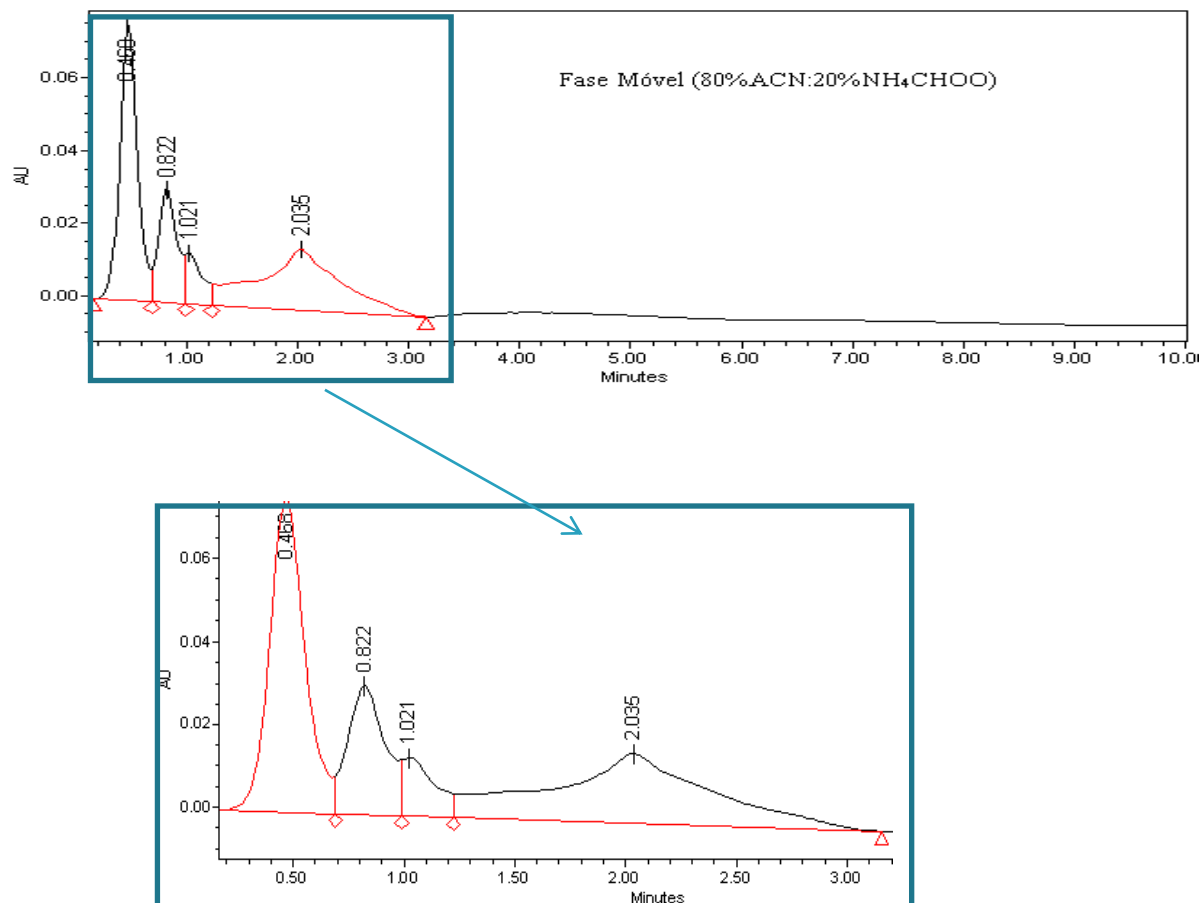


Figura 3.12: Perfil cromatográfico a 210 nm da fase móvel (80% ACN: 20% NH_4COO) utilizada no **Método III**.

A partir dos cromatogramas calculou-se a percentagem de recuperação da melamina nas diversas amostras fortificadas testadas. Os resultados obtidos encontram-se na **Tabela 3.1**. Os resultados mostram que, para todos os métodos, a percentagem de recuperação da melamina foi sempre superior a partir dos brancos de procedimento fortificados do que das bolachas de arroz fortificadas. Os resultados mostram ainda que o **Método I-MM Luna** foi o que permitiu alcançar as percentagens de recuperação mais elevadas, tendo-se conseguido um valor próximo dos 100% para o branco de procedimento.

Tabela 3.1: Percentagens de recuperação de melamina a partir dos Brancos de Procedimento e da matriz alimentar (bolachas de arroz) fortificados a 2,5 mg/kg utilizando os métodos I, II e III.

Métodos	Recuperação (%) ao nível de Fortificação 2,5 mg/kg		
	Brancos de Procedimento	Matriz Alimentar	
Método I - MM Luna	97	66	
Método II - MM Biopharm	10	3	
Método III - MM Agilent	Kinetex Hilic	Kinetex Hilic	Zin-Hilic
	65	43	35

Assim, após a aplicação de três distintos métodos de extracção e análise de melamina, verificou-se que foi o **Método I-MM Luna** aquele que apresentou maior selectividade, apresentando as melhores taxas de recuperação. Em contrapartida o **Método II-MM Biopharm** apresentou baixa selectividade e baixa recuperação, enquanto que o **Método III- MM Agilent**, não conseguiu distinguir a melamina dos interferentes, mesmo alterando a selectividade da fase estacionária (ver **Tabela 3.1, Figuras de 3.3 a 3.12**). Os **Métodos II e III** contemplam na sua preparação passos de limpeza de amostra (*clean-up*) que poderão explicar a perda acentuada de melamina.

Face aos resultados apresentados optou-se por implementar o **Método I - MM Luna**, tendo-se prosseguido com a validação do mesmo.

3.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO MÉTODO I – MM LUNA

3.2.1. Especificidade/Selectividade

Para a avaliação da especificidade do método adoptado procedeu-se a análise de várias matrizes complexas de forma a averiguar a existência de possíveis interferências (QPA-28, 2013).

Tendo em conta, por um lado, as notificações no portal do RASFF e, por outro lado, a susceptibilidade a fraudes/contaminações, seleccionaram-se os seguintes géneros alimentícios:

- Géneros alimentícios alvo de fraudes devido ao seu elevado conteúdo proteico: **leite sem lactose, bebida de soja e rebuçados de leite**;
- Géneros alimentícios sujeitos a contaminação com melamina através da exposição à ciromazina a montante: **ovos e bolachas de arroz**.

As **Figuras 3.13 a 3.16** mostram o cromatograma da matriz **bolacha de arroz** não fortificada, o cromatograma da mesma matriz fortificada a 2,5 mg/kg bem como o perfil de pureza e o espectro UV/Vis do pico da melamina. A observação dos perfis cromatográficos a 210 nm permitiu detectar a presença na amostra fortificada (**Figura 3.14**) de um pico que se encontra ausente no cromatograma da amostra não fortificada (**Figura 3.13**). A realização do espectro do espectro UV/Vis nesse pico (**Figura 3.16**) permitiu uma clara identificação da melamina. Assim, observando-se os perfis cromatográficos a 210 nm e os respectivos perfis de pureza e espectro UV/Vis para o pico de melamina, verificou-se que o método é selectivo para a matriz bolachas de arroz.

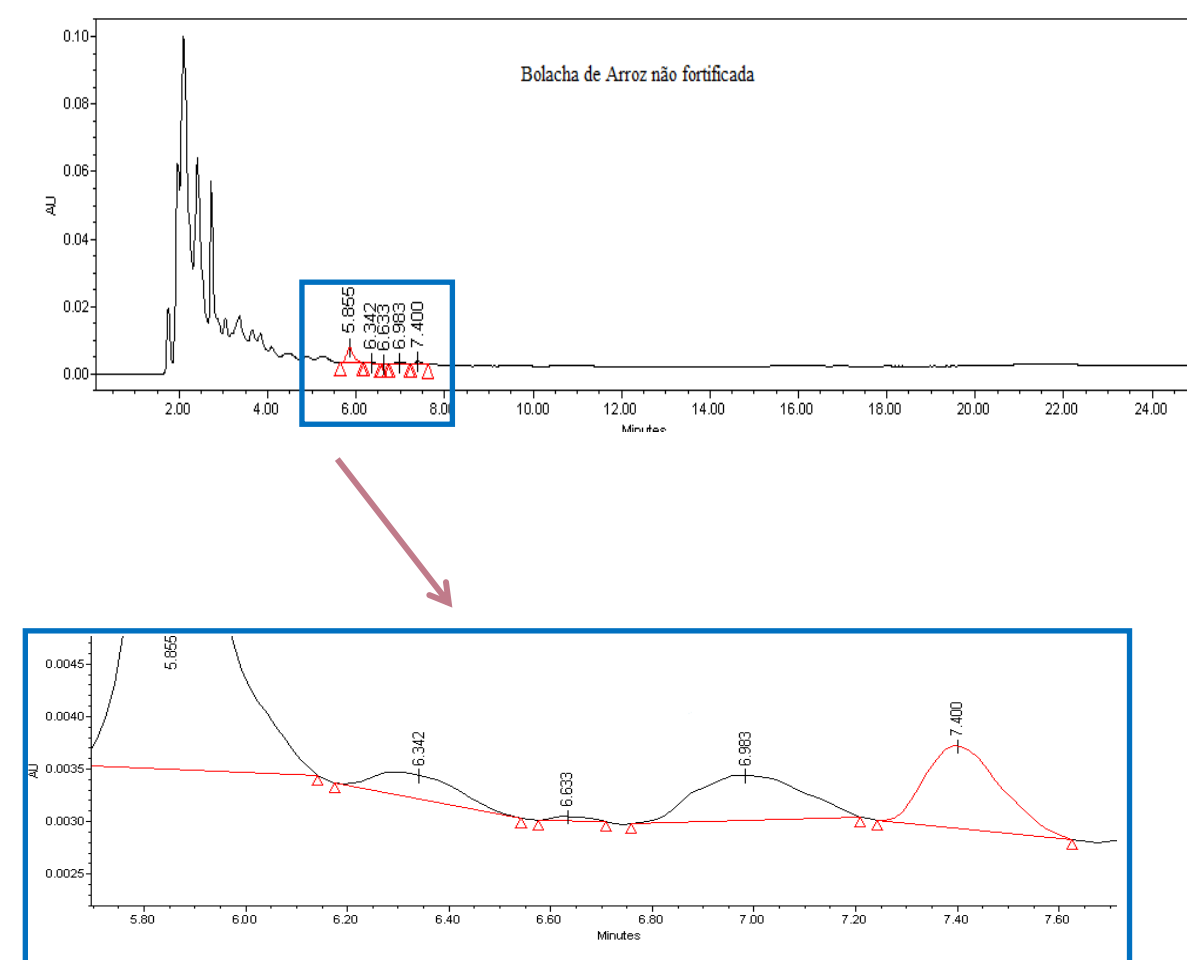


Figura 3.13: Perfil cromatográfico a 210 nm da matriz “Bolacha de Arroz não fortificada”.

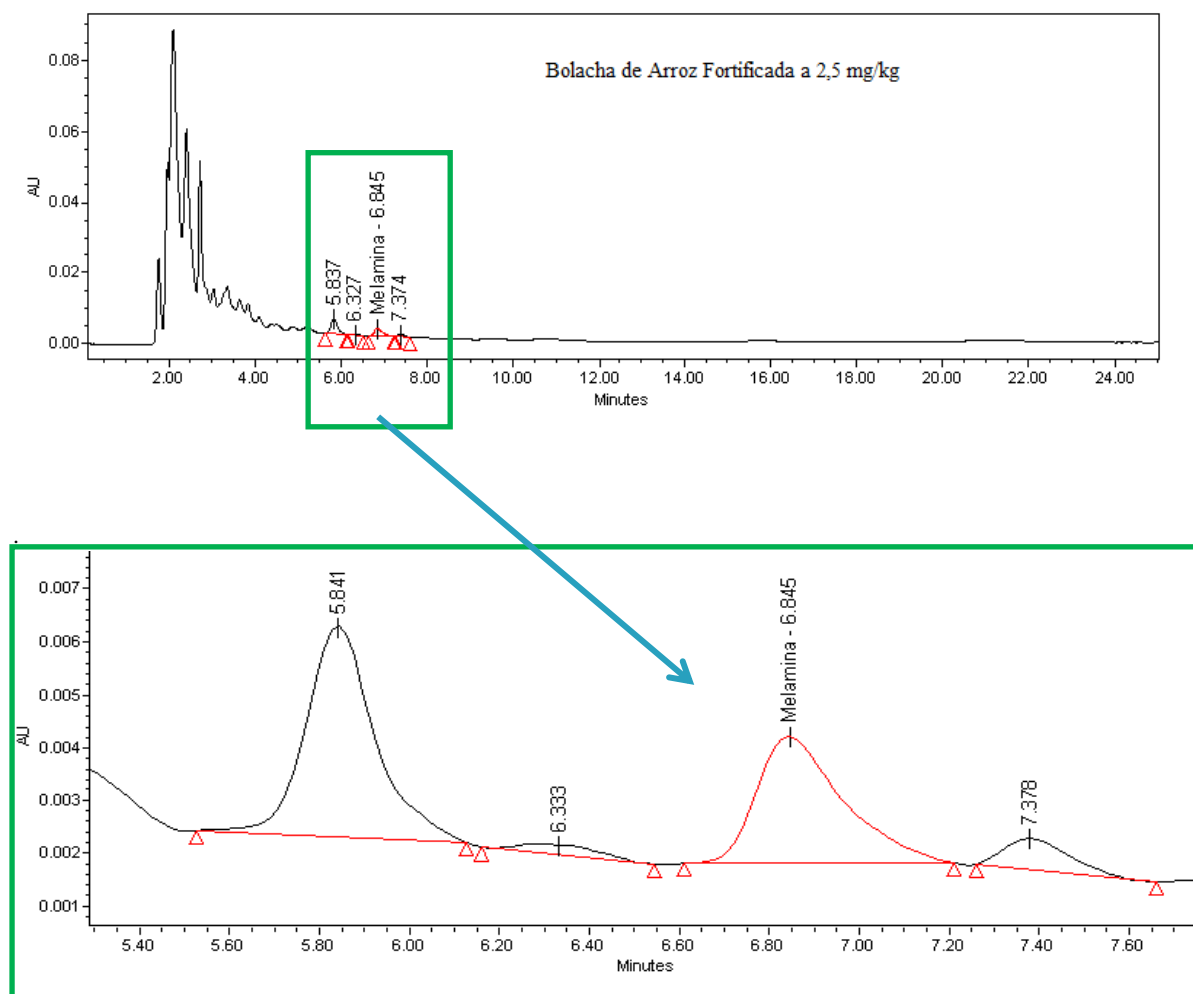


Figura 3.14: Perfil cromatográfico a 210 nm da matriz “Bolacha de Arroz Fortificada a 2,5mg/kg”.

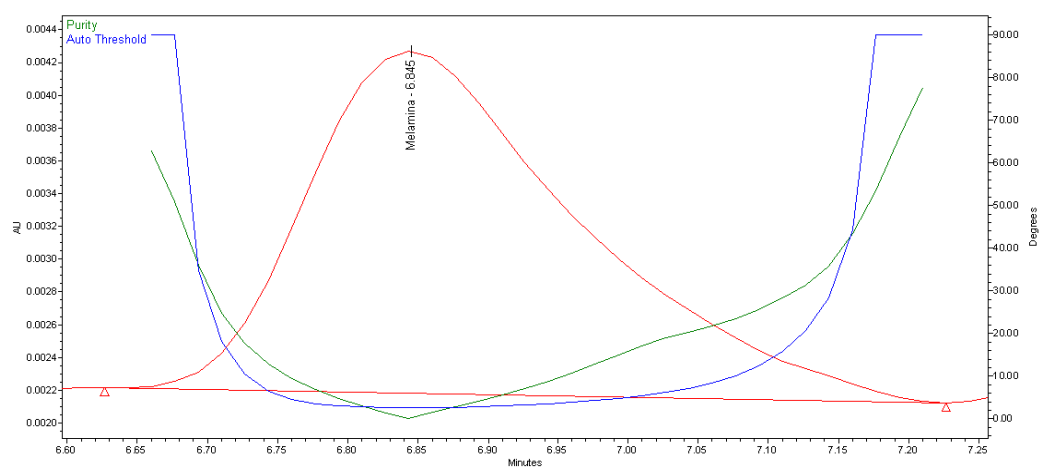


Figura 3.15: Perfil de pureza da “Bolacha de Arroz Fortificada a 2,5 mg/kg”.

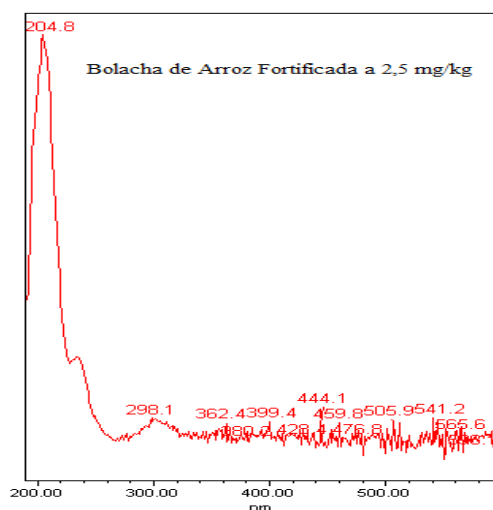


Figura 3.16: Espectro de UV/Vis da matriz “ Bolacha de Arroz Fortificada a 2,5 mg/kg”.

Realizou-se a mesma análise para a matriz “**Ovo**” (**Figuras 3.17 a 3.20**). Também neste caso a observação dos perfis cromatográficos a 210 nm permitiu detectar a presença na amostra fortificada (**Figura 3.18**) de um pico que se encontra ausente no cromatograma da amostra não fortificada (**Figura 3.17**). A realização do espectro do espectro UV/Vis nesse pico (**Figura 3.20**) permitiu uma clara identificação da melamina. Assim, observando-se os perfis cromatográficos a 210 nm e o respectivo perfil de pureza e espectro UV/Vis para o pico de melamina, verificou-se que o método é igualmente selectivo para a matriz ovo.

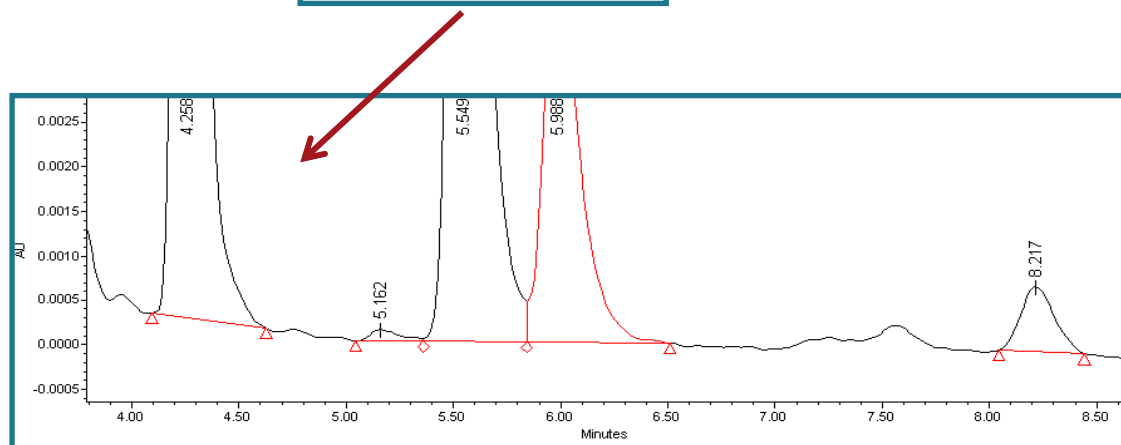
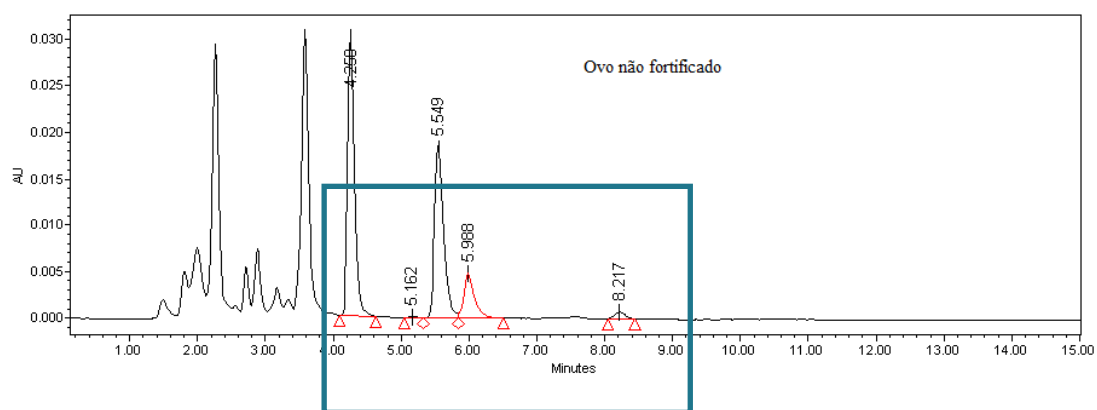


Figura 3.17: Perfil cromatográfico a 210 nm da matriz “Ovo não fortificado”.

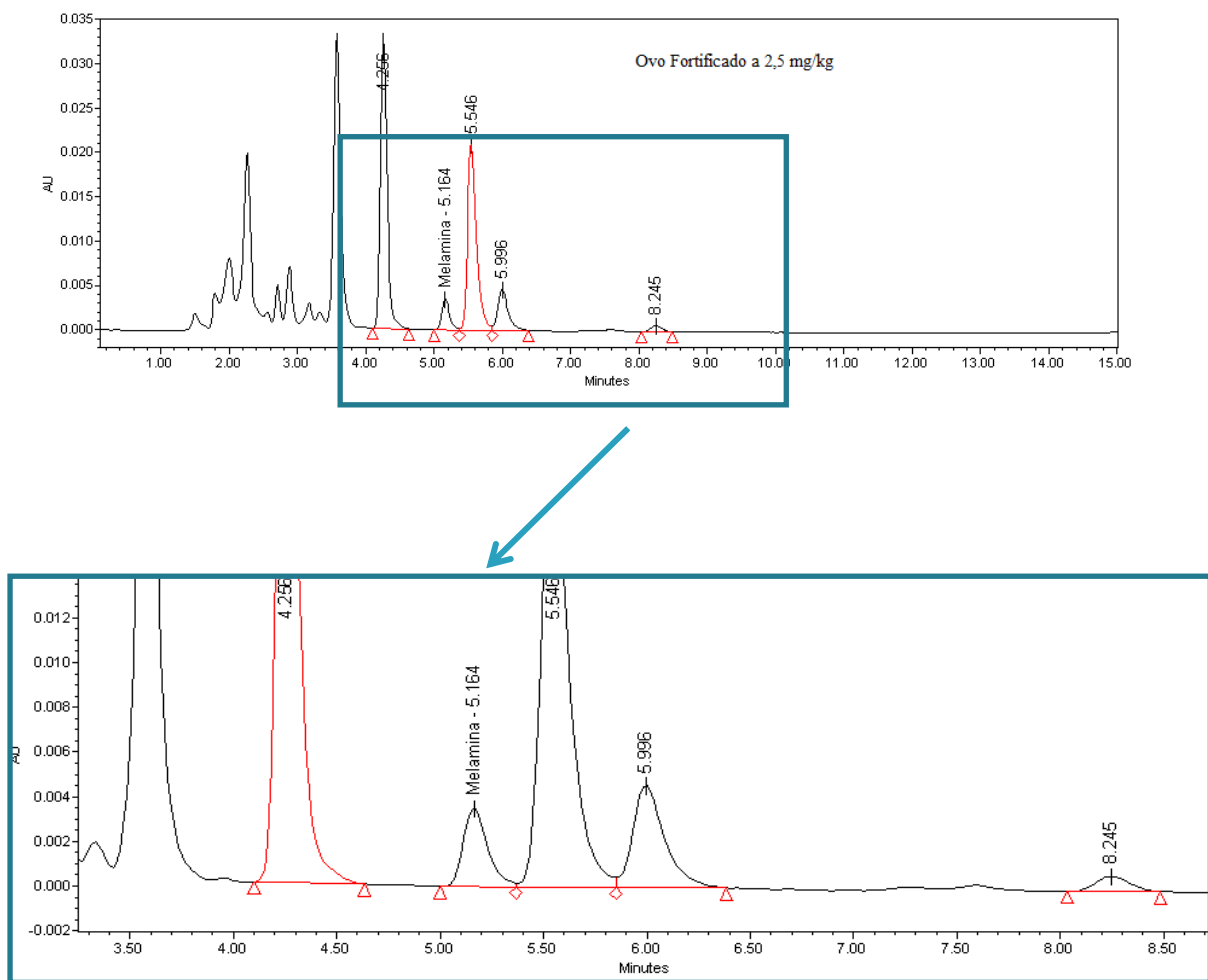


Figura 3.18: Perfil cromatográfico a 210 nm da matriz “Ovo Fortificado a 2,5 mg/kg”.

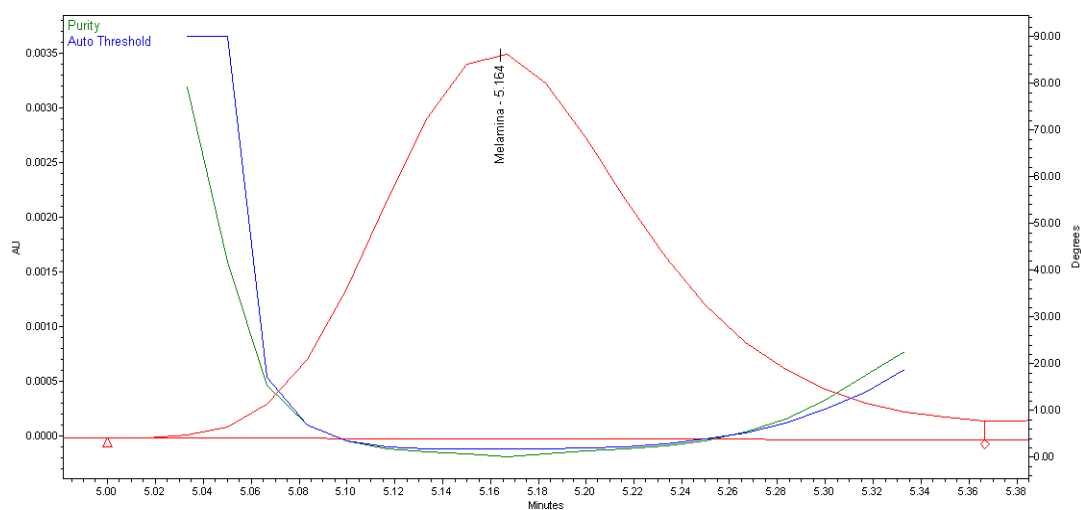


Figura 3.19: Perfil de pureza do “Ovo Fortificado a 2,5 mg/kg”.

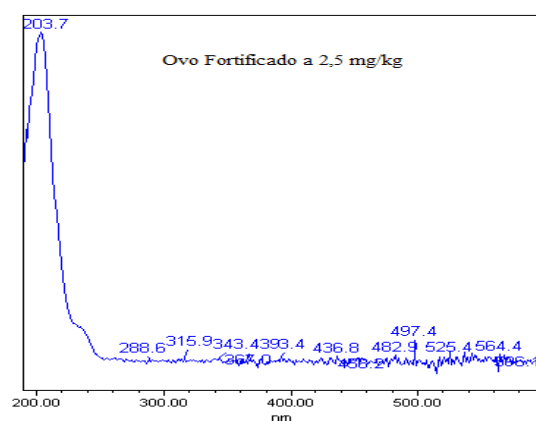


Figura 3.20: Espectro de UV/Vis da matriz “Ovo Fortificado a 2,5 mg/kg”.

Tal como verificado para as matrizes anteriores, também no caso da matriz **”Rebuçados de Leite”** (Figuras 3.21 a 3.24), foi possível concluir, através da observação dos perfis cromatográficos a 210 nm e do perfil de pureza e espectro UV/Vis para o pico de melamina, que o método é selectivo para esta matriz.

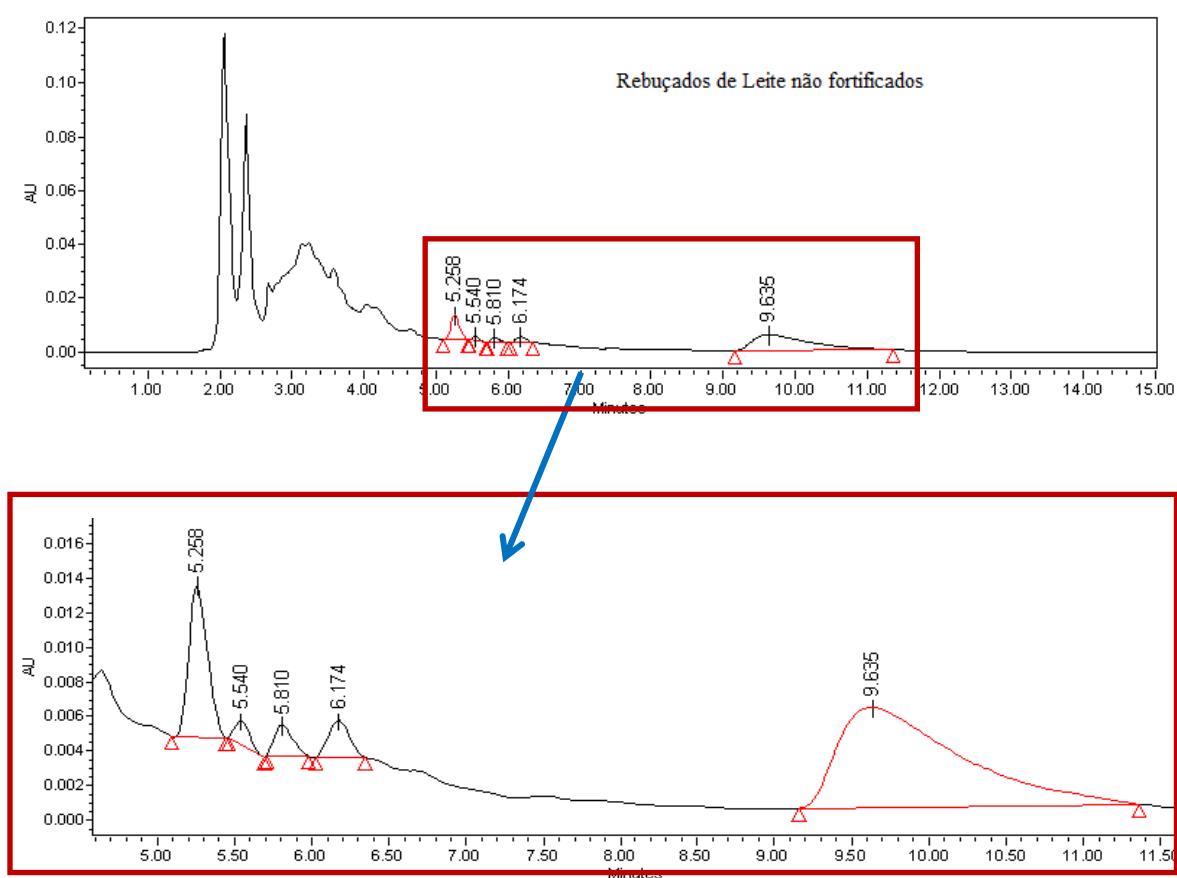


Figura 3.21: Perfil cromatográfico a 210 nm da matriz “Rebuçados de Leite não fortificados”.

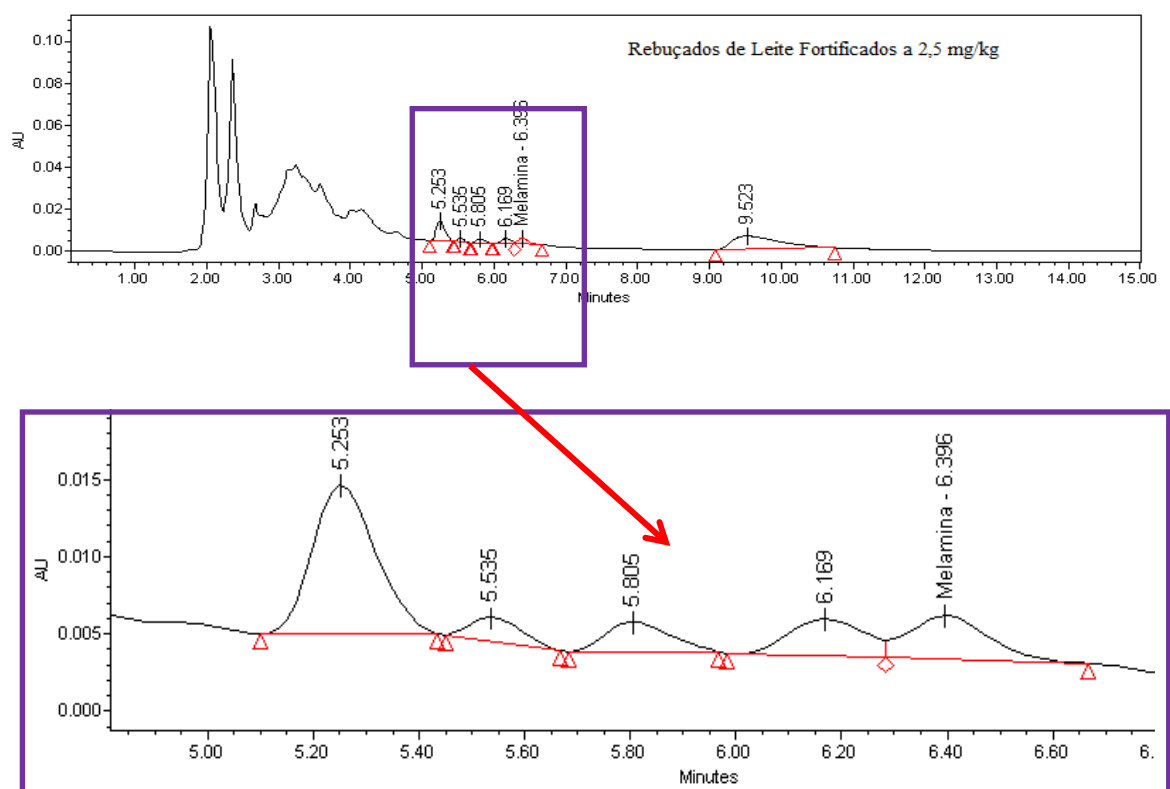


Figura 3.22: Perfil cromatográfico a 210 nm da matriz “Rebuçados de Leite Fortificados a 2,5 mg/kg”.

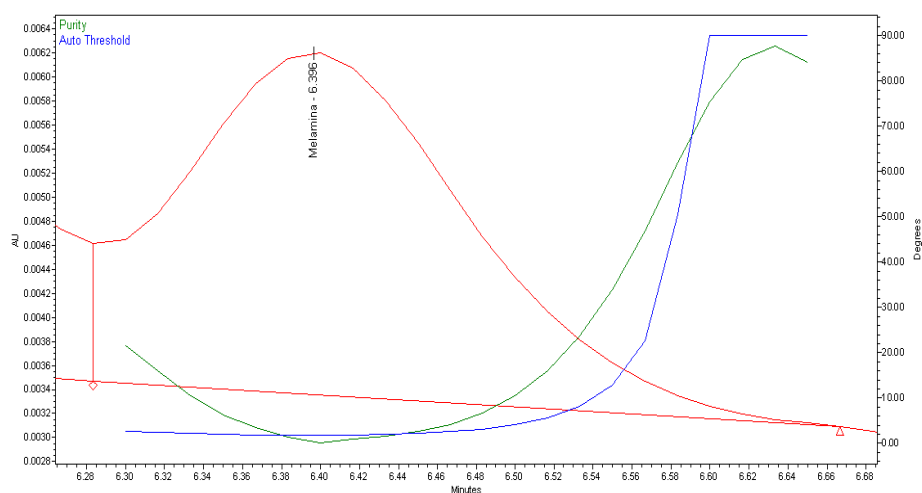


Figura 3.23: Perfil de pureza dos “Rebuçados de Leite Fortificados a 2,5 mg/kg”.

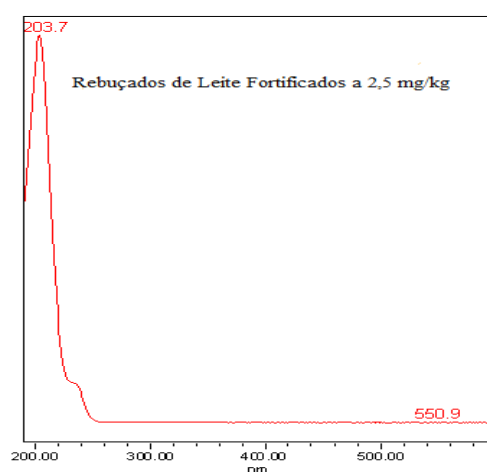


Figura 3.24: Espectro de UV/Vis da matriz “Rebuçados de Leite Fortificados a 2,5 mg/kg”.

A observação dos perfis cromatográficos a 210 nm e do perfil de pureza e espectro UV/Vis para o pico de melamina, com a “Bebida de Soja” (Figuras 3.25 a 3.28) e “Leite sem lactose” (Figuras 3.29 a 3.32) permitiu igualmente verificar que a selectividade do método para estas duas matrizes.

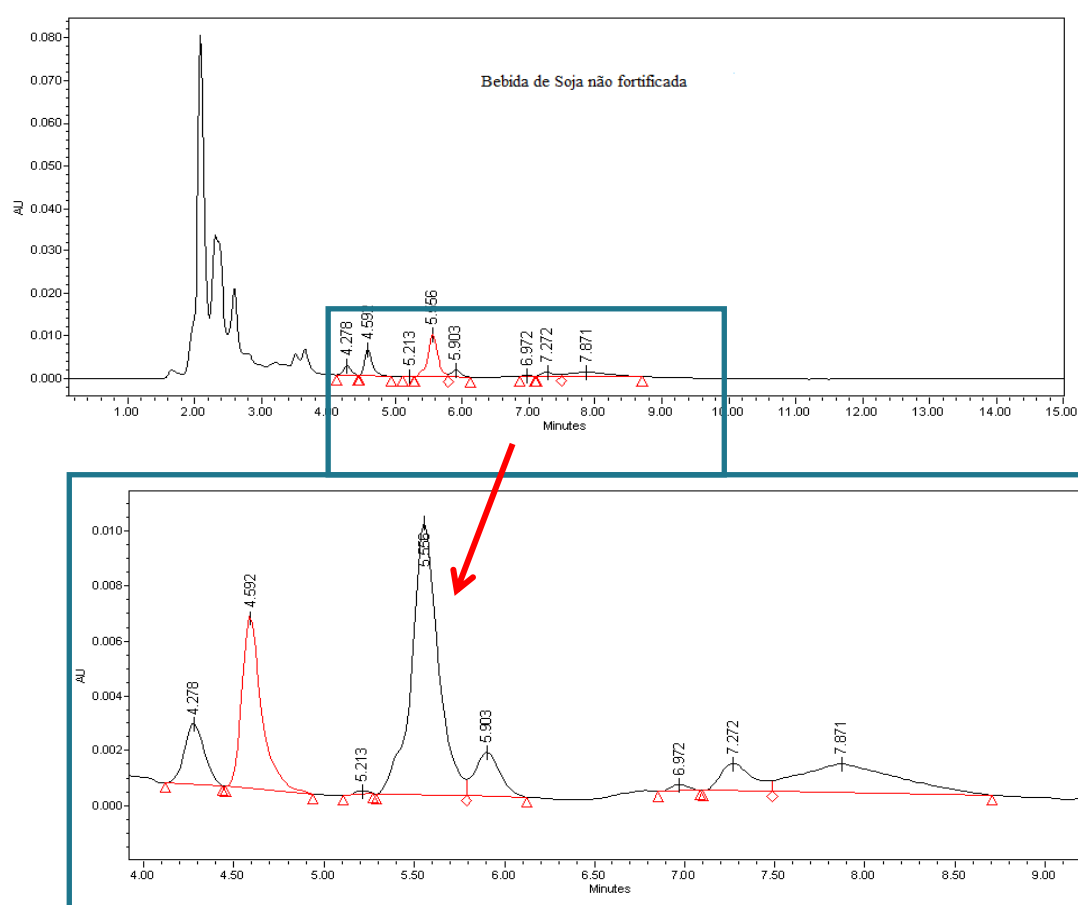


Figura 3.25: Perfil cromatográfico a 210 nm da matriz “Bebida de Soja não fortificada”.

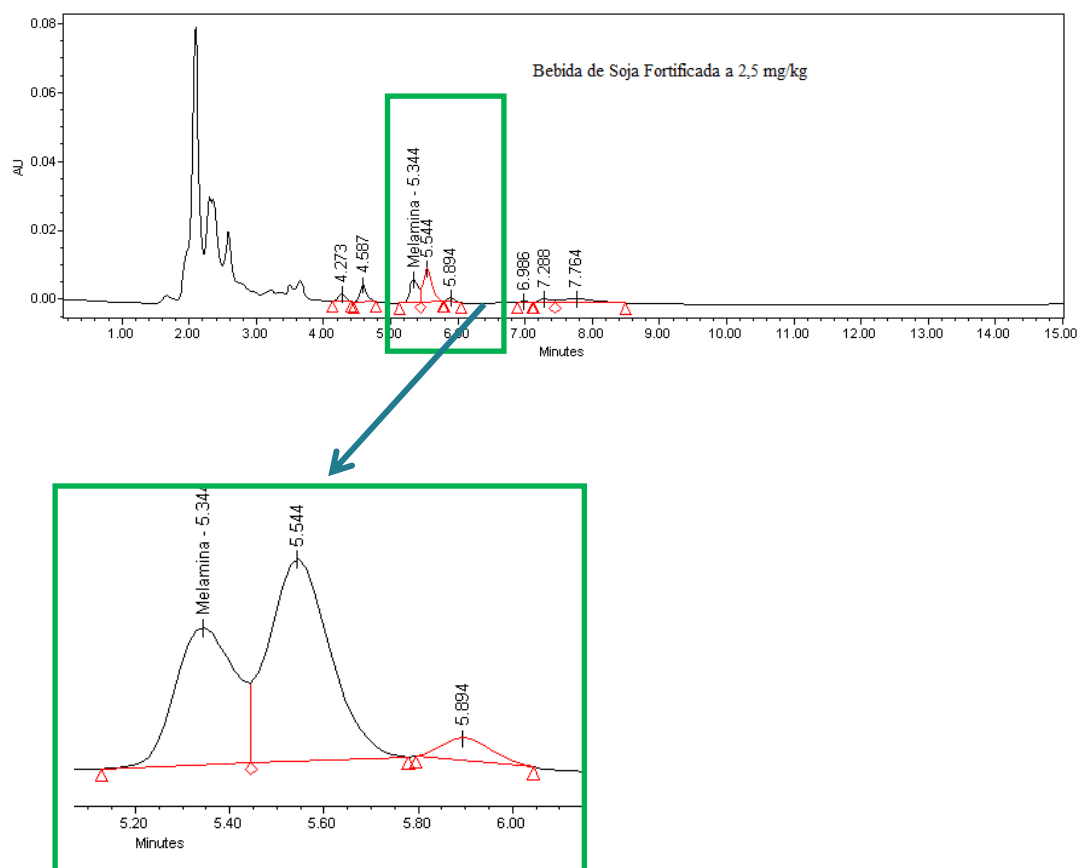


Figura 3.26: Perfil cromatográfico a 210 nm da matriz “Bebida de Soja Fortificada a 2,5 mg/kg”.

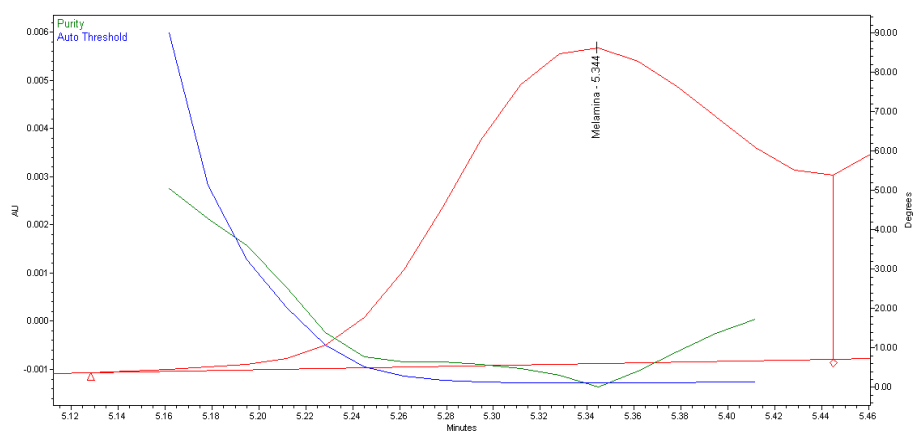


Figura 3.27: Perfil de pureza do “Bebida de Soja Fortificado a 2,5 mg/kg”.

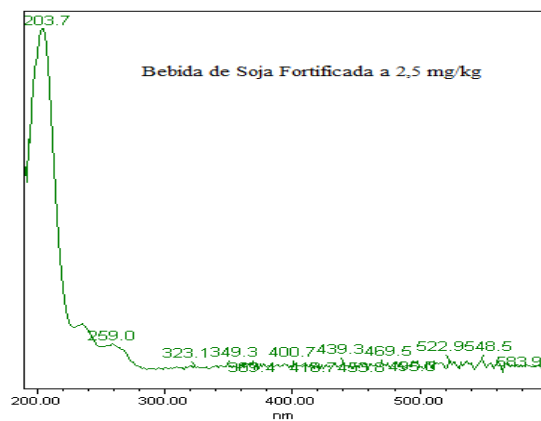


Figura 3.28: Espectro de UV/Vis da matriz “Bebida de Soja Fortificado a 2,5 mg/kg”.

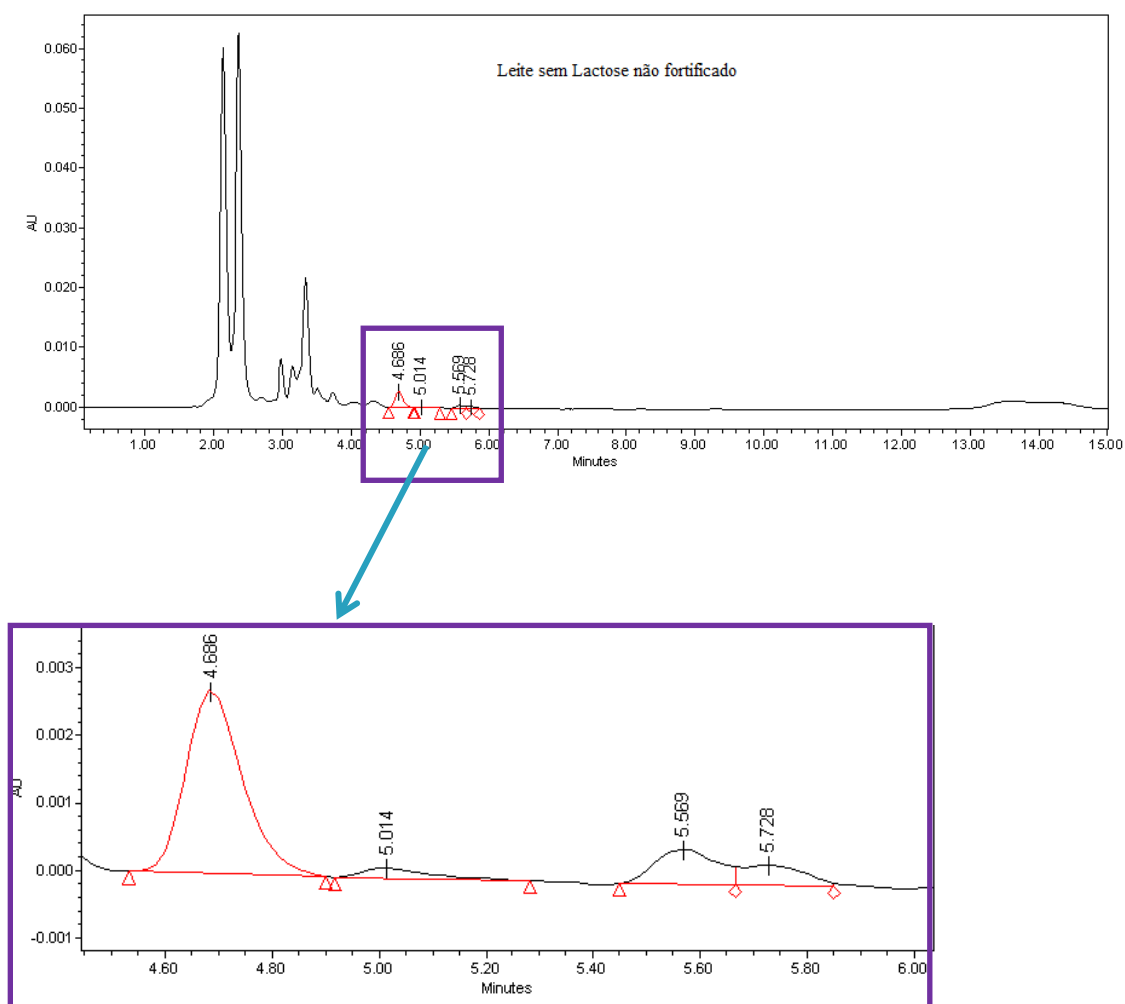


Figura 3.29: Perfil cromatográfico a 210 nm da matriz “Leite sem Lactose não fortificado”.

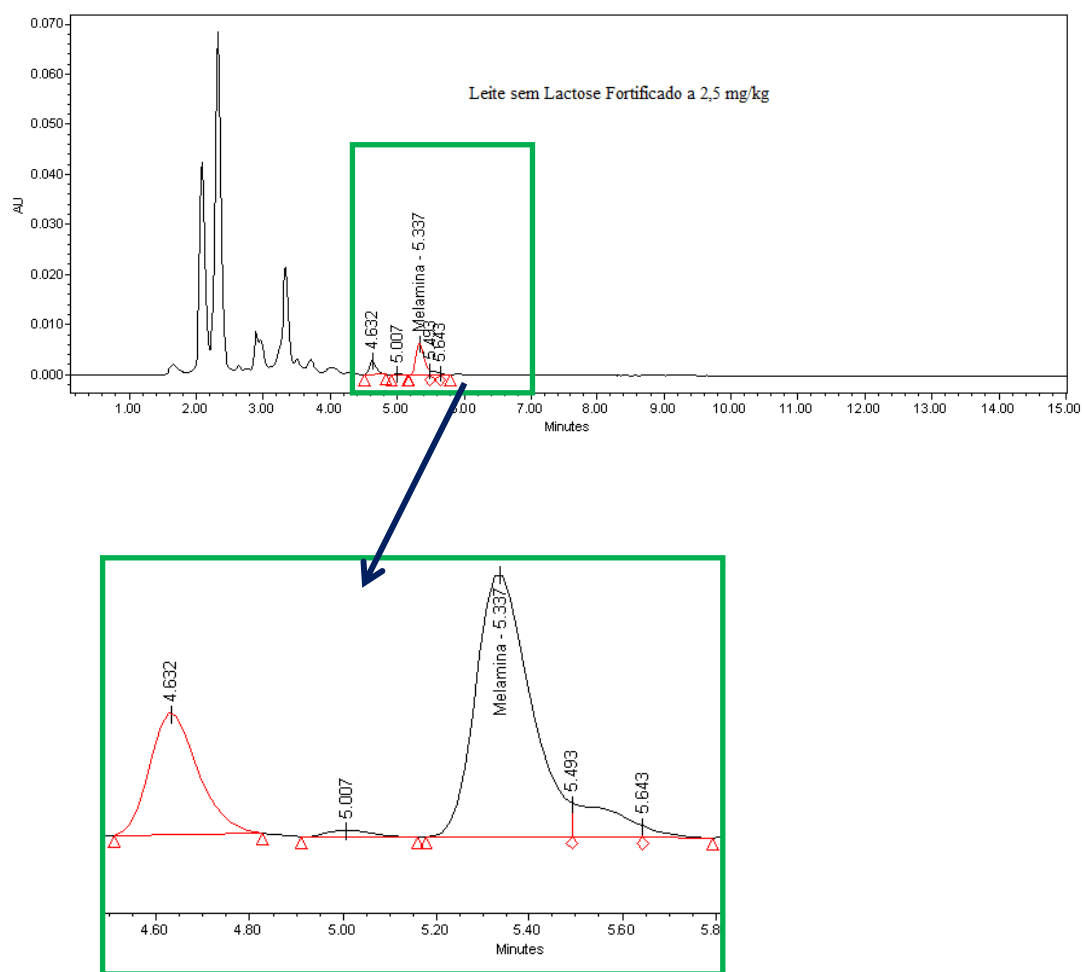


Figura 3.30: Perfil cromatográfico a 210 nm da matriz “Leite sem Lactose Fortificado a 2,5mg/kg”.

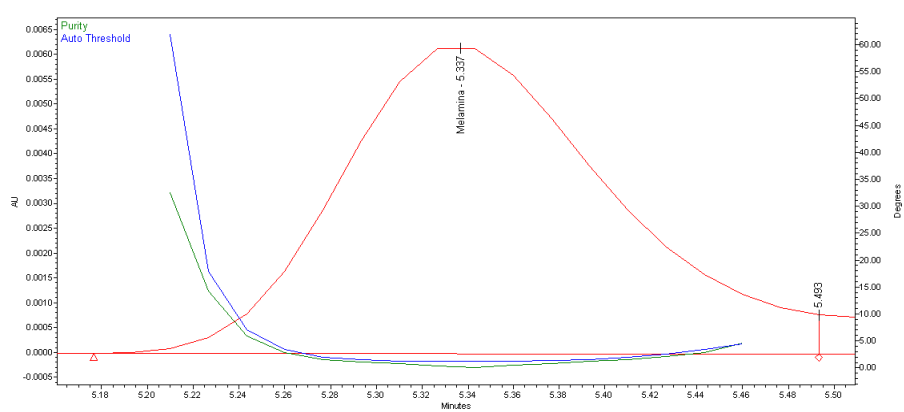


Figura 3.31: Perfil de pureza do “Leite sem Lactose Fortificado a 2,5 mg/kg”.

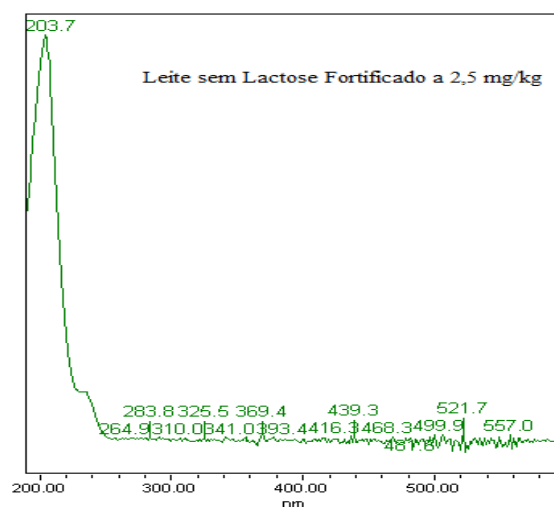


Figura 3.32: Espectro de UV/Vis da matriz “ Leite sem Lactose Fortificado a 2,5 mg/kg”.

Assim, observando-se os perfis cromatográficos a 210 nm e os respectivos perfis de pureza para o pico de melamina, verificou-se que o método é selectivo para as matrizes analisadas, obtendo-se também uma clara identificação UV/Vis em todas elas (**Figuras 3.13 a 3.32**).

3.2.2. Curva de calibração (linearidade, gama de trabalho e limiares analíticos)

No estudo da linearidade do método I-MM Luna analisaram-se soluções padrão de melamina, nas condições cromatográficas estabelecidas para o mesmo método, e representou-se graficamente as áreas do analito obtidas em função das respectivas concentrações.

Os resultados obtidos referentes à linearidade encontram-se **Tabela 3.2**. A curva de calibração obtida e figuras de mérito a ela associada encontram-se respectivamente, na **Figura 3.33** e na **Tabela 3.3**.

Tabela 3.2: Dados dos padrões de trabalho de melamina usados na elaboração da curva de calibração

[Padrões] ng/mL	Área
25	8284
50	16359
100	28916
250	72246
500	142516

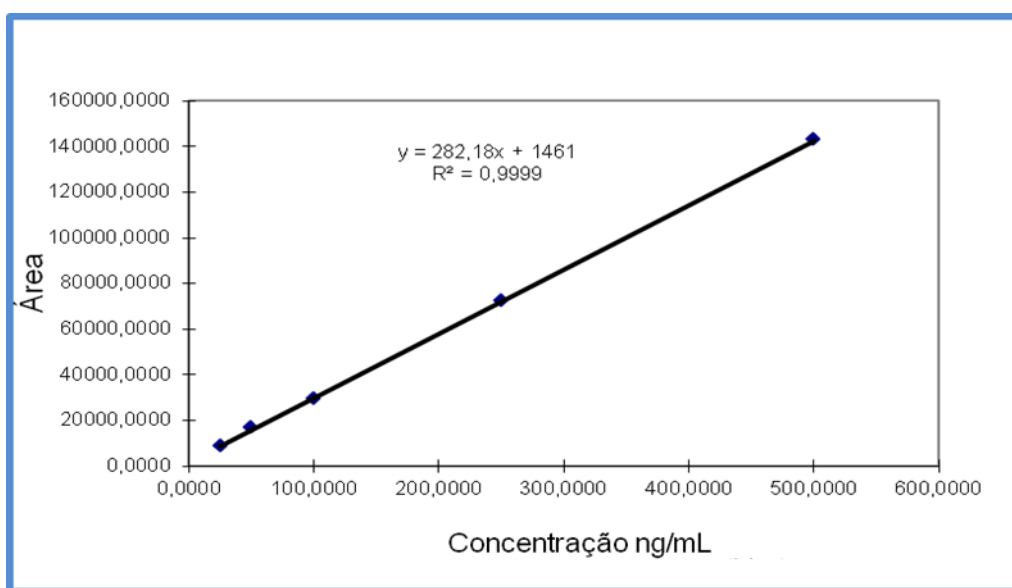


Figura 3.33: Gráfico da curva de calibração.

Tabela 3.3: Figuras de mérito da curva de calibração

Recta	$Y = b.X + a$
Declive	282,18 (mL/ng)
Ordenada	1460,95
Coef. Correl. (r)	0,99995
n	5
² Sy/x	662,60
³ LQ	23,48 ng/mL
⁴ LD	7,04 ng/mL

² Desvio padrão residual da curva, calculado através da **Equação 1.2**

³ Limite de Quantificação da curva, calculado através da **Equação 1.1**.

⁴ Limite de Detecção da curva, calculado através da **Equação 1.3**

A curva de calibração obtida, com base na análise de cinco padrões de melamina de concentrações na gama de 25 a 500 ng/mL, expressa uma correlação linear entre as concentrações e as áreas obtidas. Ela é caracterizada pela equação: $Y = 282,18 X + 1461$, tendo um coeficiente de correlação de 0,9999, muito superior ao critério de aceitação do LFQ que é de 0,995. Por outro lado, o LQ da curva (23,48 ng/mL) é inferior ao primeiro ponto da mesma (correspondente ao nível de concentração mais baixo - 25 ng/mL). Outro requisito necessário para que a curva de calibração fosse aceite é o de possuir um declive significativo, evidenciado visualmente (**Figura 3.33**), indicando que o método tem uma sensibilidade adequada.

A gama de trabalho [de 25 a 500 ng/mL] contém a concentração 100 ng/mL, correspondente a 2,5 mg/kg na amostra (igual ao valor de LMA), que é também um requisito do LFQ para a aceitação da curva de calibração (**Tabelas 3.2 e 3.3**). Cumprindo os requisitos descritos, conclui-se que o método é linear na gama de trabalho já referida.

É de referir que tendo sido a linearidade verificada entre as concentrações de 25 ng/mL e 500 ng/mL, deve ter-se em conta que os valores obtidos para a concentração de melamina nas amostras, deverão ser sempre interpolados. Isto significa que deve proceder-se à diluição da amostra quando a concentração de melamina for superior a 500 ng/mL e por outro lado, deve proceder-se à sua concentração quando o valor de melamina for inferior a 25 ng/mL. Especificamente para o caso do método implementado, a diluição poderá ser conseguida, pesando inicialmente menos quantidade de amostra, e/ou utilizando um maior volume de solvente de extracção ou ainda fazendo uma diluição no final da preparação, imediatamente antes de se injectar; poder-se-á concentrar a amostra pesando maior quantidade da mesma ou concentrando a solução final em concentrador de azoto, por exemplo (a melamina tem um ponto de ebulição elevado). Nestes casos têm que se recalcular os limites do método.

3.2.3. Limites do Método

Os valores do LD e do LQ da curva permitem determinar os limites do método. Assim, neste caso, o valor de LD na curva foi de 7,04 ng/mL. Sendo assim, e tendo-se em consideração a pesagem de 2 g de amostra e a sua extracção com um volume de solvente de 50 mL, o valor do LD do método obtido foi de 0,2 mg/kg.

De modo semelhante, e partindo do LQ da curva de 23,48 ng/mL, obteve-se o valor do LQ do método que foi de 0,6 mg/kg.

3.2.4. Precisão

A. Verificação da precisão do método analítico

O desempenho instrumental foi avaliado através de quatro injeções sucessivas de uma solução padrão de melamina, com uma concentração de 50 ng/mL, sendo calculada, de seguida, a dispersão dos resultados por meio do cálculo do desvio padrão relativo em percentagem (%RSD) (Tabela 3.4).

Tabela 3.4: Ensaios de injeção do padrão 50 ng/mL.

Padrão 50 ng/mL	Injecções	Área dos picos do padrão	Média (ng/mL)	Desvio Padrão (ng/mL)	RSD (%)
	1	16482,0	16323,8	265,5	1,6
	2	16160,0			
	3	16609,0			
	4	16044,0			

Assim, os resultados obtidos para a repetibilidade instrumental permitiram chegar a um valor de RSD de 1,6%, que pode ser considerado aceitável, garantindo por isso que esta variável não foi crítica para a avaliação dos resultados de precisão da concentração nas amostras (Tabela 3.4).

B. Verificação da precisão do método

A. Precisão intermédia / reprodutibilidade intralaboratorial do método

A precisão intermédia experimental do método foi avaliada efectuando 10 determinações independentes (desde a pesagem até à medição), sobre uma amostra homogénea de rebuçados de leite (não conforme). As determinações foram feitas no mesmo laboratório, com o mesmo analista, mas em dias diferentes. As áreas do pico de melamina (MM), constantes nos cromatogramas obtidos na análise das referidas amostras, foram convertidas em concentrações, através da curva de calibração, e corrigidas com as respectivas massas pesadas, de forma a obter a concentração de melamina em cada amostra.

Para a testar a existência de eventuais valores aberrantes nas concentrações obtidas, procedeu-se primeiramente à realização do Teste de Dixon (Tabela 3.5).

Tabela 3.5: Resultados obtidos no Teste de Dixon para um intervalo de confiança de 95%.

Teste de Dixon (todas as injeções)		
[MM] (mg/kg)	D _{calc}	D _{tab95%} (n=10)
116,6	0,358	0,530
128,2		
133,8		
142,8		
143,0		
143,4	0,130	
143,4		
144,8		
146,2		
149,0		

Não se tendo verificado a existência de nenhum valor aberrante, procedeu-se ao cálculo da dispersão dos resultados (%RSD_R), que foi posteriormente comparada com o respectivo critério de aceitação de dispersão para a concentração média, obtido pela equação de Horwitz.

Para a realização deste cálculo considerou-se a concentração média de 139,1 mg/kg convertida em $C=139,1 \times 10^{-6}$. Os resultados encontram-se na **Tabela 3.6**.

Tabela 3.6: Resultados obtidos para a precisão intermédia do método

Rebuçados de Leite “Amostra não Conforme”	Ensaio	[MM] (mg/kg)	Média (mg/kg)	Desvio Padrão S _R (mg/kg)	RSD _R (%)	Critério de Aceitação (%RSD _{RHorwitz}) para [MM]=139,1 mg/kg
	1	143,4	139,1	10,0	7,2	7,6
	2	149,0				
	3	143,4				
	4	116,6				
	5	133,8				
	6	146,2				
	7	144,8				
	8	128,2				
	9	143,0				
	10	142,8				

O valor encontrado foi de 7,2 %. Este resultado experimental foi comparado com o respectivo valor estimado pela equação de Horwitz (7,6%) (**Tabela 3.6**), concluindo-se que o método implementado se comporta melhor do que o previsto pela equação de Horwitz.

Em relação ainda à precisão intermédia, complementou-se o seu estudo com o cálculo da estimativa do limite de Reprodutibilidade, R , entre determinações, para a mesma amostra, dado pela expressão geral:

$$R = t_{Student\ 95\%} \times \sqrt{n} \times S_R$$

Equação (3.1)

Em que:

S_R – desvio padrão obtido em condições de reprodutibilidade/precisão intermédia = 10,0 mg/kg

n – nº de determinações; para ensaios em duplicado, $n = 2$ (caso mais desfavorável)

$t_{Student\ 95\%}$ – valor de $t_{Student}$ a um nível de confiança de 95% = 1,96

Assim, com base no desvio padrão da precisão intermédia experimental, determinou-se um valor de 27,7 mg/kg para o limite de reprodutibilidade.

B. Repetibilidade do método

De modo semelhante ao que se procedeu para o estudo da precisão intermédia do método, em 10 ensaios independentes da amostra de rebugados (concentração alta de MM – cerca de 140 mg/kg), também se avaliou a repetibilidade do método nos ensaios em duplicado, para as 5 matrizes em estudo, numa concentração próxima do LMA. Determinou-se o desvio padrão de repetibilidade (s_r) de acordo com a equação (ISO 5725;1994), encontrando-se os resultados na **Tabela 3.7**.

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum (X_1 - X_2)^2}{2 \cdot t}}$$

Equação (3.2)

Em que:

X_1 e X_2 – resultados dos duplicados da amostra

t - número de matrizes analisadas = 5

Tabela 3.7: Resultados obtidos para a repetibilidade do método.

Matriz Alimentar	Determinação X ₁ [MM] (mg/kg)	Determinação X ₂ [MM] (mg/kg)	[MM] Média (mg/kg)	[MM] Média Global (mg/kg)	Desvio Padrão S _r (mg/kg)	RSD _r (%)	Critério de Aceitação (%RSD _{rHorwitz}) para [MM]=2,2 mg/kg
Ovos	2,24	2,71	2,48	2,21	0,15	6,8	9,5
Rebuçados de Leite	2,48	2,47	2,48				
Bebida de Soja	2,33	2,33	2,33				
Leite sem Lactose	2,12	2,12	2,12				
Bolachas de Arroz	1,68	1,63	1,66				

Assim, o valor obtido para o desvio padrão relativo de repetibilidade experimental foi de 6,8%, considerando uma concentração média de melamina nas matrizes de 2,2 mg/kg. Este resultado é inferior ao do RSD_{rHorwitz} (9,5%), concluindo-se que o método implementado se comporta melhor do que o previsto pela equação de Horwitz.

Também para a repetibilidade do método se procedeu ao cálculo da estimativa do limite de repetibilidade, r , de acordo com a equação abaixo:

$$r = t_{Student\ 95\%} \times \sqrt{n} \times S_r$$

Equação (3.3)

Em que:

S_r – desvio padrão obtido em condições de repetibilidade = 0,15 mg/kg

n – nº de determinações; para ensaios em duplicado, $n = 2$

$t_{Student\ 95\%}$ – valor de $t_{Student}$ a um nível de confiança de 95% = 1,96

Assim, com base no desvio padrão obtido em condições de repetibilidade, determinou-se um valor de 0,41 mg/kg para o limite de repetibilidade, r .

Os resultados de precisão intermédia e repetibilidade experimentais do método, confrontados com os estimados pela equação de Horwitz, mostram-nos que o método implementado pode ser considerado preciso.

3.2.5. Exactidão

A. Ensaios de Recuperação

A recuperação da melamina foi estimada pela análise de dois ensaios independentes das amostras: ovo; leite sem lactose, bebida de soja e rebuçados de leite fortificadas a 2,5 mg/kg

Os resultados da percentagem de recuperação da melamina nas cinco matrizes alimentares fortificadas encontram-se na **Tabela 3.8**.

Tabela 3.8: Percentagens de recuperação da melamina nas cinco matrizes alimentares analisadas.

Matriz Alimentar	Ensaio	[MM] (mg/kg)	[MM] Média (mg/kg)	Taxa de Recuperação Média (%)	Taxa de Recuperação por grupos de matrizes (%)
Ovos	1	2,24	2,48	99,2	97,0
	2	2,71			
Rebuçados de Leite	1	2,48	2,47	98,9	
	2	2,46			
Bebida de Soja	1	2,33	2,33	93,2	
	2	2,33			
Leite sem Lactose	1	2,12	2,12	84,7	84,7
	2	2,12			
Bolacha de Arroz	1	1,68	1,66	66,2	66,2
	2	1,63			

Na avaliação da exactidão, verificou-se que as taxas de recuperação, considerando o mesmo nível de fortificação (2,5 mg/kg), variaram de matriz para matriz, tal como o previsto. Assim, optou-se por agrupar as matrizes que obtiveram taxas de recuperação próximas dos 100%, considerando então que a recuperação global obtida para os ovos, rebuçados de leite e bebida de soja foi de 97%. O leite sem lactose e as bolachas de arroz apresentaram valores de recuperação mais

baixos, 84% e 66%, pelo que estas percentagens devem ser consideradas no cálculo das concentrações reais de melamina na análise de futuras amostras das mesmas matrizes (**Tabela 3.8**).

B. Cálculo de z-score num material de referência (MR):

Sempre que possível, os Materiais de Referência (MR) devem ser usados no processo de validação de um método de ensaio (Relacre, 2000). Foi com este objectivo que se procedeu à análise do MR “FAPAS 3039 - Leite em Pó” para uma avaliação mais completa da exactidão do método, utilizando o procedimento e a curva de calibração adoptados.

Os resultados obtidos neste ensaio apresentam-se na **Tabela 3.9** e nas **Figuras 3.34, 3.35 e 3.36**.

Tabela 3.9: Dados para o cálculo de *z-score* e respectivo valor obtido.

Matriz	X_{lab} (mg/kg)	X_v (mg/kg)	Incerteza, u (mg/kg)	σ_p (mg/kg)	<i>z-score</i>
“FAPAS 3039- Leite em Pó”	2,66	2,41	0,049	0,338	0,7

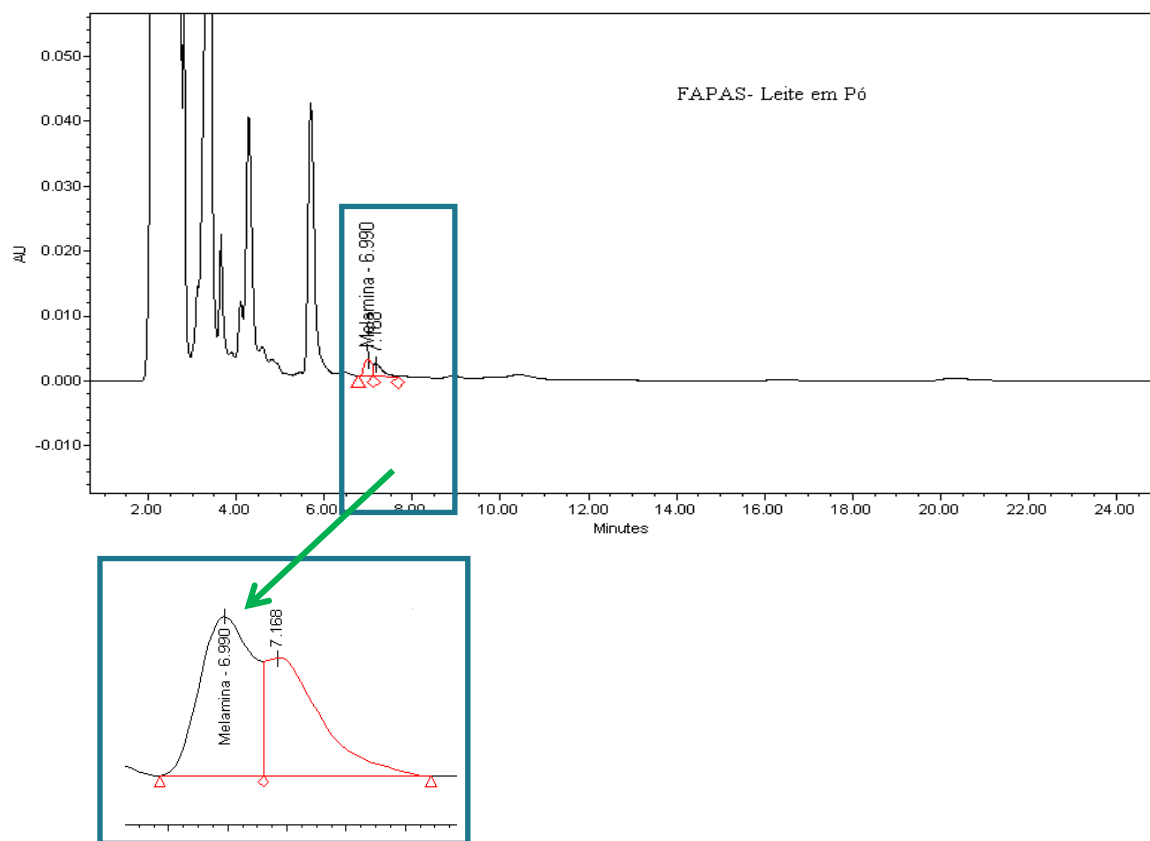


Figura 3.34: Perfil cromatográfico a 210 nm do “FAPAS 3039-Leite em Pó”.

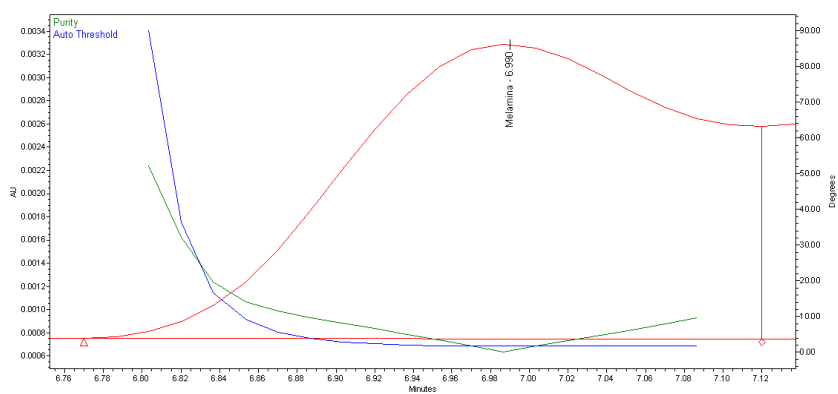


Figura 3.35: Perfil de pureza do “FAPAS 3039-Leite em Pó”.

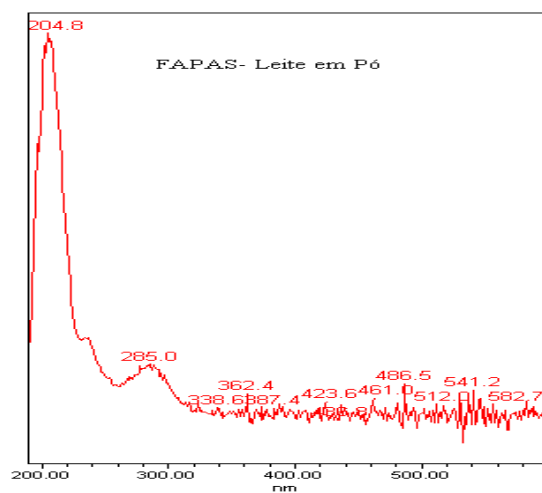


Figura 3.36: Espectro de UV/Vis da matriz “FAPAS 3039- Leite em Pó”.

Assim, complementou-se o estudo da exactidão com a realização da análise de um leite em pó MR (FAPAS 3039), tendo-se verificado que o resultado obtido foi Satisfatório, uma vez que o valor de *z-score* foi de 0,7 (**Tabela 3.9**). Este resultado significa que com o método implementado se conseguiu determinar de forma correcta a concentração de melamina no material de referência utilizado.

4. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Analisando globalmente todos os resultados obtidos ao longo da realização do presente trabalho, podemos concluir que, o método implementado, Método I-MM Luna, tem grande potencial para ser aplicado em rotina, na análise da melamina, pois para além de ser simples, rápido e económico, é selectivo para as matrizes estudadas, linear, preciso, exacto e com limites de detecção e quantificação bastante abaixo do limite legislado (2,5 mg/kg).

Incidentes relacionados com adição fraudulenta de melamina a géneros alimentícios, como os ocorridos no passado recente, poderão eventualmente repetir-se num futuro próximo devido à crescente necessidade de fontes proteicas. Por outro lado, o uso extensivo, na agricultura, de pesticidas como a ciromazina, não terá tendência a abrandar nos próximos anos, pelo que a contaminação de géneros alimentícios com melamina, por esta via, tenderá a aumentar. Assim, a implementação de um método expedito de análise de melamina em alimentos por HPLC, que ao mesmo tempo mostrou ser simples, rápido e económico revela-se de extrema importância face à contínua necessidade do controlo em rotina deste contaminante. Acresce ainda que o método implementado foi validado utilizando várias matrizes alimentares alvo, em relação a fraude/contaminação com melamina, tendo-se obtido resultados bastante satisfatórios.

Seria desejável investir em mais estudos envolvendo o método adoptado, nomeadamente, realizando mais ensaios de quantificação de melamina em matrizes alimentares já estudadas neste trabalho. Deste modo obter-se-ia um histórico que, provavelmente, revelaria que se poderia vir a baixar alguns dos limites estudados, como por exemplo, os limites de detecção e quantificação, LD e LQ, e os limites de precisão, r e R .

Não seria de excluir igualmente a possibilidade de aplicar e estudar este método em mais matrizes de interesse, nomeadamente outras referenciadas no portal do RASFF. Eventualmente, para algumas matrizes mais complexas, seria necessário introduzir um passo de *clean-up* (através, por exemplo, da utilização de colunas SPE) mas, nesse caso, este passo teria que ser muito bem optimizado para se minimizarem as perdas de analito.

A quantificação de ciromazina na análise de matrizes que foram sujeitas, a montante, ao tratamento legal com este pesticida/droga veterinária, também deveria ser equacionada, já que a definição do LMA para a melamina, nestes casos, está dependente da concentração encontrada para o referido precursor (Regulamento (UE) nº 594/2012).

Idealmente poderia pensar-se em desenvolver, por LC-MS, um método de quantificação simultânea de melamina e ciromazina em matrizes de géneros alimentícios e de alimentação animal. Esta técnica hifenada tem potencial para vir a proporcionar análises de ciromazina/melamina com maior selectividade e sensibilidade. Por outro lado, muito provavelmente, desta forma, poderiam ser

evitados passos de *clean-up* que normalmente fazem baixar as taxas de recuperação dos analitos e tornam mais morosas as preparações.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, Thamara. *Detecção de adulteração em leite: análises de rotina e espectroscopia de infravermelho*. Trabalho para a cadeira (Seminários Aplicados), Programa de pós-graduação em ciência animal, Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, 2013.

ASAE. *Página oficial da ASAE*. Disponível em: <http://www.asae.pt/>. Consultado a 7 de Agosto de 2017.

Biopharm *Melamine Clea-up Column. Product Code 111*, Solid phase clean-up columns for use in conjunction with HPLC, s.d.

Branco, Paula. *Cromatografia*. Curso de formação ASAE. 2012

Branco, Paula. *Leite e Produtos Lácteos*. Revista: Riscos e Alimentos, ASAE. 2013 (5):25-28

Chou, S., Hwang, D., Lee, H. *High Performance Liquid Chromatographic Determination of Cyromazine and Its Derivative Melamine in Poultry Meats and Eggs*. Journal of Food and Drug Analysis 2003; 11 (4): 290-295.

Decisão 2008/757/EC de 26 de Setembro que impõe condições especiais que regem a importação de produtos que contenham leite ou produtos lácteos originários ou expedidos da China. Jornal Oficial da União Europeia, L 259/10 de 29 de Setembro de 2008, 1-2.

Decisão 2008/798/CE de 14 de Outubro que impõe condições especiais às importações de produtos contendo leite ou produtos lácteos provenientes ou expedidos da China e revoga a Decisão 2008/757/CE. Jornal Oficial da União Europeia, L 273/18 de 15 de Outubro de 2008, 1-3.

Decisão 2008/921/CE de 9 de Dezembro que altera a Decisão 2008/798/CE. Jornal Oficial da União Europeia, L 331/19 de 10 de Dezembro de 2008, 1-2.spe

Direcção-Geral da Saúde e dos Consumidores da Comissão Europeia. *Annual Report 2007*. The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) 2008.

EFSA. Reasoned opinion on the modification of the existing MRLs for cyromazine in various leaf vegetables and fresh herbs. EFSA Journal 2015; 13(1):4004.

EFSA. Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) and EFSA Panel Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF). *Scientific Opinion on Melamine in Food and Feed*. EFSA Journal 2010; 8(4): 1573

EFTA Surveillance Authority. *Portal da EFTA Surveillance Authority*. Disponível em: <http://www.eftasurv.int/>. Consultado a 14 de Agosto de 2017.

Escobar, A., Faure, R., Sosa, D., Ponce, P., Vega, S. *Melamina. Un Problema Potencial Para La Salud Animal Y Humana Como Adulterante En Los Alimentos Com Énfasis En La Leche*. Revista: Salud Animal. 2010; 32 (1): 22-31

Fukuji, T.S. *Propostas Metodológicas para componentes em matrizes alimentícias, alimentos enriquecidos e contaminantes utilizando electroforese capilar acoplada à espectrometria de massas e detecção Uv-Vis*. Tese de Doutorado Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade de São Paulo, Instituto de Química, 2011.

IARC. Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–120, disponível em http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/List_of_Classifications.pdf, acessado em Agosto de 2017.

Instituto Português de Acreditação. *Anexo de Acreditação L0209-I*. 2016

ISO 5725:1994. *Preview Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results*, Partes 1-6.

Kim, Byungchul. *Analysis of Melamine and Cyanuric Acid by Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Tandem Mass Spectrometry*. Dissertação para o Grau de Doutorado de Filosofia em Ciências da Alimentação e Nutrição, The University of Maine, 2009.phe

Marín, L., Martín, N., Martínez, M. *Adulteraciones Com Melamina*. Deontología y Veterinaria Lega, 2014, 4-22.

Mi, J., Zhang, Z., Zhang, Z., Li, P., Fang, Y. *Rapid Screening and Confirmation of Melamine Residues in Milk and Its Products by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*. Agilent Technologies, Publication Part Number: 5989-9950EN, 2008; Disponível em <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5989-9950EN.pdf>.

Muñiz-Valencia, R., Ceballos-Magaña, S.G., Rosales-Martinez, D., Gonzalo-Lumbreras, R., Santos-Montes, A., Cubedo-Fernandez-Tapiella, A., Izquierdo-Hornillo, R.C. *Method development and validation for melamine and its derivatives in rice concentrates by liquid Chromatography. Application to animal feed samples*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008; 392:523-531.

Nascimento, C.F. *Desenvolvimento de procedimento analítico limpo e com alta sensibilidade para a determinação de Melamina em leite*. Dissertação Mestrado em Química na Agricultura e Ambiente, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 2014.

QPA-38, *Validação de métodos*. Manual de Procedimentos do Laboratório de Segurança Alimentar, ASAE, 2013.

QPA-58, *Equação de Horwitz – Precisão/Fidelidade*. Manual de Procedimentos do Laboratório de Segurança Alimentar, ASAE, 2011.

RASFF. *Portal do RASFF*. Disponível em: https://ec.europa.eu/food/safety/rasff_en. Consultado a 31 de Março de 2017

Regulamento (CE) N° 1135/2009 da Comissão de 25 de Novembro que impõe condições especiais às importações de determinados produtos provenientes ou expedidos da China e revoga a Decisão 2008/798/CE da Comissão. Jornal Oficial da União Europeia, L 311/3 de 26 de Novembro de 2009, 1-3.

Regulamento (UE) n° 594/2012 da Comissão de 5 de Julho de 2012, que altera o Regulamento (CE) n° 1881/2006 no que se refere aos teores máximos dos contaminantes ocratoxina A, PCB não semelhantes a dioxinas e Melamina nos géneros alimentícios. Jornal Oficial da União Europeia, L176/43 DE 6 de Julho de 2012, 3.

Regulamento (UE) N° 107/2013 da Comissão de 5 de Fevereiro, que altera o anexo I da Directiva 2002/32/CE do Parlamento Europeu e do Conselho no que se refere aos limites máximos de Melamina em alimentos enlatados para animais de companhia. Jornal Oficial da União Europeia, L 35/1 de Fevereiro de 2013, 1-2.

Regulamento (UE) 2016/1 da Comissão de 3 de Dezembro de 2015 que altera os anexos II e III do Regulamento (CE) n° 396/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho no que se refere aos limites máximos de resíduos de bifenazato, boscalide, ciazofamida, Círomazina, dazomete, ditiocarbamatos, fluazifope-P, mepanipirime, metrafenona, piclorame, propamocarbe, piridabena, piriofenona, sulfoxaflor, tebuconazol, tebufenepirade e tirame no interior e à superfície de determinados produtos. Jornal Oficial da União Europeia, L 2/1 de 5 de Janeiro de 2016, 1-21.

Relacre. *Guia Relacre n° 13 Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*, Fevereiro de 2000; 50p, ISBN: 972-8574-02-9.

Wu, Y., Zhang, Y. *Analytical chemistry, toxicology, epidemiology and health impact assessment of Melamine in infant formula: Recent progress and developments*. Food and Chemical Toxicology 2013; 56: 325– 335.